
Struktur, Funktion und mikrobielle Biosynthese methylierter Menachinon-Derivate

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr.rer.nat.)
genehmigte Dissertation von

Sascha Hein
aus Gummersbach

1. Referent: Prof. Dr. Jörg Simon
2. Referent: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Darmstadt 2019

Hein, Sascha : Struktur, Funktion und mikrobielle Biosynthese
methylierter Menachinon-Derivate

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019

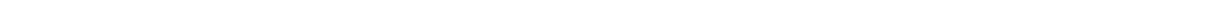
Tag der mündlichen Prüfung:

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-84968

Veröffentlicht unter CC BY-NC-ND 4.0



Für meine Eltern



1. Inhaltsverzeichnis

1.....Inhaltsverzeichnis	II
2.....Abkürzungsverzeichnis	1
3.....Zusammenfassung	4
4.....Einleitung	5
4.1. Isoprenoide Chinone	5
4.1.1. Naphthochinone	7
4.1.2. Biosynthese von Menachinon	8
4.1.3. Der klassische Menachinon-Biosyntheseweg (Men)	8
4.1.4. Der Fualosin-Biosyntheseweg (Mqn)	9
4.2. Chinonbiosynthese in <i>Wolinella succinogenes</i>	10
4.2.1. Biosynthese von MMK ₆ in <i>Wolinella succinogenes</i>	12
4.3. Die Superfamilie der radikalischen S-Adenosylmethionin Enzyme	13
4.3.1. Radikalische S-Adenosylmethionin-Methyltransferasen	15
5.....Ziele der Arbeit	18
6.....Material und Methoden	19
6.1. Chemikalien und Geräte	19
6.2. Medien, Spurenelemente, Antibiotika und Kultivierung von Mikroorganismen	19
6.2.1. Nährmedien und Supplemente für die Kultivierung von <i>Wolinella succinogenes</i>	19
6.2.2. Nährmedien für die Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	20
6.2.3. Nährmedium für die Kultivierung von <i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	21
6.2.4. Nährmedium für die Kultivierung von <i>Shewanella oneidensis</i>	21
6.2.5. Bestimmung der Zelldichte	22
6.2.6. Antibiotika	22
6.3. Molekularbiologische Methoden	23
6.3.1. Isolierung von DNA	23
6.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA	23
6.3.3. Sequenzanalyse	23
6.3.4. Agarose-Gelelektrophorese	24
6.3.5. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion	24
6.3.6. CPEC	26
6.3.7. Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	26
6.3.8. Ligation	27
6.3.9. Transformation von <i>Wolinella succinogenes</i>	27
6.3.10. Charakterisierung von <i>Wolinella succinogenes</i> Transformanden	27
6.3.11. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	28
6.4. Biochemische Methoden	28
6.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford	28

6.4.2.	Eisenquantifizierung	28
6.4.3.	Sulfid-Bestimmung	29
6.4.4.	Sulfit-Bestimmung	30
6.4.5.	Formiat-Bestimmung	30
6.4.6.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese - SDS-Page	31
6.4.7.	Coomassie-Färbung	32
6.4.8.	Häm-Färbung	32
6.4.9.	Western Blot und ELISA	32
6.4.10.	Heterologe Produktion Menachinon-Methyltransferasen in <i>E. coli</i>	33
6.4.11.	Produktion und Reinigung von Menachinon-Methyltransferasen in <i>E. coli</i>	34
6.4.12.	Heterologe Produktion von Fpr und FldA in <i>E. coli</i>	37
6.4.13.	Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Zentrums in Menachinon-Methyltransferasen	39
6.4.14.	Aktivitätsassay von MenK	40
6.4.15.	Enzymtests mit Deuterium-markierten Substraten	42
6.4.16.	Erstellung der Vektoren	42
6.5.	Chemische Methoden	46
6.5.1.	Chinon-Extraktion	46
6.5.2.	Chinon-Analyse mittels HPLC	46
6.5.3.	Cyclische Voltammetrie von Chinonen	47
6.5.4.	Cyclische Voltammetrie von Proteinen	48
6.5.5.	NMR-Analyse	49
6.5.6.	Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)	49
7. ...	Strukturen und Redoxpotentiale methylierter Menachinon-Derivate	50
7.1.	Struktur von Methylmenachinon-6	50
7.2.	Struktur von Dimethylmenachinon-6	53
7.3.	Bestimmung der Redoxpotentiale der methylierten Menachinone	57
7.4.	Diskussion	59
7.4.1.	Struktur von Methylmenachinon-6 aus <i>W. succinogenes</i>	59
7.4.2.	Struktur von Dimethylmenachinon-6	59
7.4.3.	Redoxpotentiale der methylierten Menachinone	60
8. ...	Biosynthese der methylierten Menachinon-Derivate	61
8.1.	Heterologe Produktion von MqnK aus <i>W. succinogenes</i> in <i>E. coli</i>	61
8.2.	Charakterisierung der Menachinon-Methyltransferasen MenK aus <i>Adlercreutzia equolifaciens</i> und <i>Shewanella oneidenis</i>	62
8.3.	Identifizierung der C-7-spezifischen Menachinon-Methyltransferase MenK2 von <i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	65
8.4.	Charakterisierung von AeMenK2 und AeMenK2-AeMenK-Chimären in <i>E. coli</i>	71
8.5.	Methylierung von DMK durch AeMenK2	74
8.6.	Diskussion	76

8.6.1.	Charakterisierung von C-8-Menachinon-Methyltransferasen	76
8.6.2.	Identifizierung und heterologe Produktion der C-7-Menachinon-Methyltransferase aus <i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	76
8.6.3.	Ursachen für die positionsspezifische Methylierung von Menachinon(derivaten)	77
9....	Funktion von MMK und Regulation des MMK-Gehalts	80
9.1.	Regulation des 8-MMK ₆ -Gehalts in <i>W. succinogenes</i>	80
9.2.	Einfluss von 8-MMK ₆ auf die Elektronentransportaktivität der Sulfid-Respiration von <i>W. succinogenes</i>	83
9.3.	Regulation des MMK ₇ -Gehalts in <i>S. oneidensis</i>	85
9.4.	Diskussion	86
9.4.1.	Regulation des 8-MMK ₆ Gehalts in <i>W. succinogenes</i>	86
9.4.2.	Bedeutung von 8-MMK ₆ in <i>W. succinogenes</i>	87
10...	Biochemische Charakterisierung der Menachinon-Methyltransferasen	89
10.1.	<i>In vitro</i> Nachweis der Methyltransferaseaktivität von MBP-AeMenK	89
10.2.	Produktion und Reinigung von AeMenK-His	90
10.3.	AeMenK-His besitzt ein sauerstoffsensibles [4Fe-4S]-Zentrum	91
10.4.	Bestimmung des Redoxpotentials des Eisen-Schwefel-Zentrums von AeMenK-His	93
10.5.	Methylierung von MK ₄ durch AeMenK-His	94
10.6.	Substrate und Produkte der Methylierungsreaktion von AeMenK-His	98
10.7.	Identifizierung von möglichen Nebenprodukten	101
10.8.	Analyse der Methylierungsreaktion mithilfe von deuterierten Substraten	102
10.9.	Diskussion	106
10.9.1.	Reaktionsmechanismus von AeMenK-His	106
11...	Fazit und Ausblick	114
12...	Literaturverzeichnis	116
13...	Anhang	125
14...	Publikationen	144
15...	Konferenzbeiträge	145
16...	Stipendien	146
17...	Beiträge Anderer	147
18...	Curriculum Vitae	148
19...	Danksagung	149
20...	Ehrenwörtliche Erklärung	150

2. Abkürzungsverzeichnis

5-Ado	5'-Desoxyadenosin
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
<i>Ae</i>	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>
Amp	Ampicillin
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
Apr	Apramycin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aTc	Anhydrotetracyclin
AU	<i>Absorption Units</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoffatom
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
ChQ	Chlorobiumchinon
cmp	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
cPCR	Kolonie-PCR
CPEC	<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CV	Säulenvolumen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHNA	1,4-Dihydroxy-2-Naphtholsäure
DMK	2-Demethylmenachinon
DMMK	Dimethylmenachinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E_0'	Standardredoxpotential
$E_{1/2}$	Halbstufenpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_{pa}	Anodisches Signalpotential
E_{pc}	Kathodisches Signalpotential
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Faraday-Konstante
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FldA	Flavodoxin
Fe	Eisen
FMN	Flavinmononukleotid

Fpr	Flavodoxin-Reduktase
g	Gramm
g	Gravitationsfeldstärke
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	hochauflösend
HSL	Homoserinlacton
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Gleichgewichtskonstante
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Lysogeny broth
ln	Natürlicher Logarithmus
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
M	Molar
mAU	Milliabsorptionseinheit
MBP	Maltose-Bindeprotein
Mcc	Multihaem Cytochrom c
MDMK	Methyl-2-Demethylmenachinon
MHz	Megahertz
min	Minute
MK	Menachinon
MK ₄ -d ₇	Deuteriertes MK
MKH ₂	Menachinol
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMK	Methylmenachinon
MS	Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
MTA	Methylthioadenosin
MTK	Methionachinon
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
Na	Natrium
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
ng	Nanogramm
NifB	<i>Nitrogen Fixation</i> Protein B
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanz
Nrf	Formiat-abhängige Nitrit Reduktase
P	Promotor

PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pD	<i>potentia "Deuterii"</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PhQ	Phyllochinon
ppm	<i>Parts per million</i>
PVDC	Polyvinylidenchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RS	Radikalisches SAM
RSMT	Radikalische SAM-abhängige Methyltransferase
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
s	Sekunde
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SAM-d ₃	Deuteriertes SAM
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
So	<i>Shewanella oneidenis</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
Spec	Spectinomycin
T	Temperatur
t-Ado	5'-Thioadenosin
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TB	Teriffic broth
TBABF ₄	Tetrabutylammonium tetrafluoroborat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-triazin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TW	<i>Trip wire</i>
U	Unit
UQ	Ubichinon
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i>
var.	Variabel
VIS	Visible spectroscopy
w/v	<i>Weight per volume</i>
Ws	<i>Wolinella succinogenes</i>
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm

3. Zusammenfassung

Die meisten biologischen Spezies der Erde sind abhängig von isoprenoiden Chinonen, welche in ihren Atmungsketten vorkommen. Bei Spezies in anaeroben Habitaten dominieren Menachinon (MK) und dessen methylierte Derivate Methylmenachinon (MMK) und Dimethylmenachinon (DMMK) als membrangebundene Redoxmediatoren. Gerade den methylierten Menachinonen wird eine essentielle Rolle in Elektronentransportketten zugeschrieben, die bei relativ negativen Standardredoxpotentialen operieren. Jedoch war die genaue Struktur und die Biosynthese der methylierten Menachinone bis dato unklar. Diese Arbeit beschreibt die Identifizierung und Charakterisierung neuartiger C-8 Menachinon-Methyltransferasen, welche zur Klasse C der radikalischen SAM Methyltransferasen (RSMT) gehören. Die Enzyme wurden MenK oder MqnK genannt, in Abhängigkeit davon welchen MK-Biosyntheseweg die MMK-produzierenden Organismen nutzen. Die heterologe Produktion der *mqnK/menK*-Gene aus *Wolinella succinogenes*, *Adlercreutzia equolifaciens* und *Shewanella oneidensis* in *Escherichia coli* führte zu einer Produktion von 8-MMK₈ bzw. dem bisher nicht beschriebenen C-8 methylierten 2-Demethylmenachinon (8-MDMK₈). Die Position der Methylgruppen der isolierten Chinone wurde mithilfe zweidimensionaler NMR bestimmt, und durch cyclovoltammetrische Messungen wurde für die methylierten Derivate ein negativeres Redoxpotential gemessen als für Menachinon. Des Weiteren wurde im Genom des DMMK-produzierenden Organismus *A. equolifaciens* ein weiteres *menK*-Homolog (*menK2*) identifiziert. MenK2 wurde in *E. coli* sowie in *W. succinogenes* produziert, was zu einer spezifischen Methylierung des Menachinons an Position C-7 führte. In Kombination mit dem nativen MqnK wurde in *W. succinogenes* erfolgreich 7,8-DMMK₆ produziert. Durch die Charakterisierung von chimären Proteinen aus Teilen von MenK und MenK2 wurde der Teil der Methyltransferasen, der für die ortsspezifische Methylierung entscheidend ist, eingegrenzt. Die biochemische Charakterisierung der gereinigten C-8 Menachinon-Methyltransferase aus *A. equolifaciens* (AeMenK) zeigte die Existenz eines sauerstoffsensiblen und redoxaktiven [4Fe-4S]-Zentrums. Nach der Entwicklung eines Aktivitätstests wurden durch LC-MS basierte Methoden und dem Einsatz von deuterierten Substraten zum einen die Stöchiometrie der Produkte der Methylierungsreaktion bestimmt und zum anderen der Nachweis erbracht, dass die Methylierung des nicht-nukleophilen Kohlenstoffatoms des Menachinons über einen radikalischen Mechanismus erfolgt. Mithilfe dieser Erkenntnisse wurde der Reaktionsmechanismus von AeMenK aufgeklärt. Die gewonnenen Ergebnisse erlauben nicht nur die Nutzung der MenK2- und MenK/MqnK-Enzyme als Biomarker zur Vorhersage der MMK- und DMMK-Produktion, sondern erweitern auch das Verständnis über die Enzymologie der Klasse C RSMT-Enzyme. Dieses Wissen ist essentiell, um zukünftige biotechnologische Prozesse für die Methylierung von inerten Kohlenstoff- oder Phosphoratomen zu entwickeln.

4. Einleitung

4.1. Isoprenoide Chinone

Isoprenoide Chinone kommen in allen drei Domänen des Lebens vor (Nowicka & Kruk 2010, Kublik *et al.*, 2016). Durch ihre hydrophobe Isopren-Seitenkette besitzen isoprenoide Chinone einen lipophilen Charakter und sind daher in der Membran von Organismen lokalisiert (Nowicka & Kruk, 2010). Die Anzahl der Isopreneinheiten in der Seitenkette (zu erkennen als Index) und der Sättigungsgrad der Seitenkette der Chinone ist organismenspezifisch. Für alle Chinone typisch ist die reversible zwei-Elektronen-Reduktion des Chinons zur Chinol- (Hydrochinon-)Form (Abb. 1).

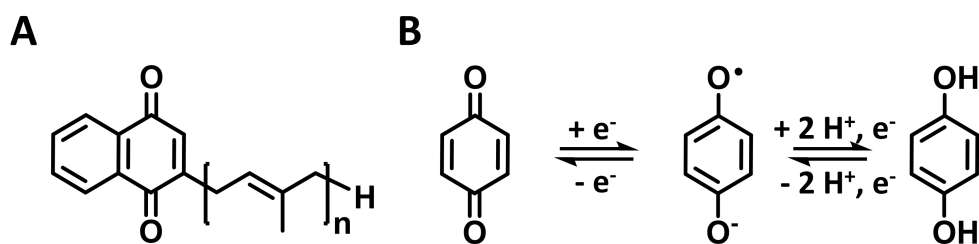


Abbildung 1 Struktur und Redoxaktivität von Chinonen. (A), Struktur von 2-Demethylmenachinon. Die Klammer mit dem Index n gibt die Zahl der Isopreneinheiten in der Seitenkette an. (B), Reversible Reduktion des chinoiden Systems vom Chinon (Rechts) zum Chinol (Links). Durch die Aufnahme eines Elektrons entsteht das Semiradikal-Anion, welches durch eine weitere Elektronenaufnahme und die Bindung zweier Protonen zum Chinol reduziert wird. Diese Zwei-Schritt-Reduktion ist reversibel, sodass durch die Abgabe zweier Elektronen und Protonen die Chinon-Form wieder entstehen kann.

In dieser Zwei-Schritt-Reduktion wird das Chinon durch die Aufnahme eines Elektrons zum Semiradikal-Anion reduziert. Dieser Übergangszustand ist instabil, kann aber durch eine Proteinumgebung stabilisiert werden. Durch diese Eigenschaft spielen Chinone eine wichtige Rolle als Mediatoren zwischen Ein- und Zwei-Elektronenprozessen. Nimmt das Semiradikal-Anion ein weiteres Elektron auf, wird es zur Chinolform reduziert. Die Membranständigkeit der isoprenoiden Chinone und die Eigenschaft der reversiblen Elektronenaufnahme und -abgabe machen die isoprenoiden Chinone zum perfekten Elektronenshuttle zwischen Proteinkomplexen, wie z.B. den Komplexen aerober und anaerober Atmungsketten (Soballe & Pool, 1999). Die reversible Elektronenaufnahme und -abgabe ist abhängig vom Redoxpotential. Das Redoxpotential ist für jedes Chinon spezifisch. Für den Chinon-vermittelten Elektronentransport zwischen zwei Proteinkomplexen ist es essentiell, dass das Redoxpotential des Chinon/Chinol-Paares zwischen den Redoxpotentialen des Elektronendonator-Paares und des Elektronenakzeptor-Paares liegt (Abb. 2). Diese Eigenschaft nutzen Mikroorganismen, indem sie ihre Chinonkomposition in der Membran an Umwelteinflüsse anpassen. Beispielsweise produziert *E. coli* in einer aeroben Atmosphäre das

Chinon Ubichinon ($E_0' = +100$ mV), um Elektronen vom Elektronendonator NADH zu Sauerstoff zu transportieren (Unden & Bongaerts, 1997). Ist kein Sauerstoff verfügbar und die Atmosphäre damit anaerob, reguliert *E. coli* den Chinonpool und produziert unter anderem Menachinon (Unden & Bongaerts, 1997; Sharma *et al.*, 2013). Durch die Produktion von Menachinon ist *E. coli* in der Lage, Elektronen z.B. von Formiat über Menachinon ($E_0' = -70$ mV) auf Fumarat zu übertragen (Unden & Bongaerts, 1997). Eine Übertragung der Elektronen von Ubichinon ($E_0' = +100$ mV) auf Fumarat ($E_0' = +30$ mV) ist unter Standardbedingungen bei pH 7,0 dagegen endergon. Aus Abbildung 2 wird ebenfalls ersichtlich, dass die Oxidation von Menachinol durch Polysulfid oder Sulfid aufgrund des niedrigen Redoxpotentials beider Elektronenakzeptoren energetisch ungünstig ist. Es ist jedoch prinzipiell möglich, durch Änderung des MK/MKH₂-Verhältnisses in der Membran, das unter Standardbedingungen ungünstige Redoxpotential zu relativieren.

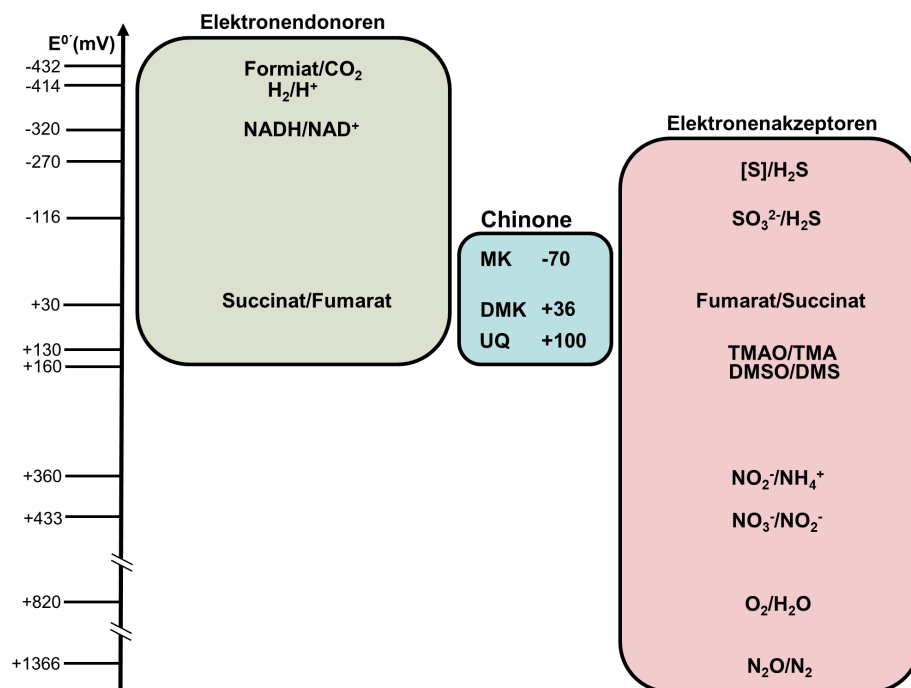


Abbildung 2 Redoxpotentialskala von typischen Elektronendonoren, Chinonen, und Elektronenakzeptoren. MK: Menachinon; DMK: 2-Demethylmenachinon; UQ: Ubichinon; NADH/NAD⁺: Nicotinamadenindinukleotid; TMAO: Trimethylamin-*N*-oxid; TMA: Trimethylamin; DMSO: Dimethylsulfoxid; DMS: Dimethylsulfid. Die E_0' -Werte der Chinone in mV sind im blauen Kasten angegeben. Verändert nach Magalon & Alberge, 2016.

Diese konzentrationsabhängige Änderung des Redoxpotentials beschreibt die Nernst-Gleichung. Daher sind in biologischen Systemen Elektronenübergänge, die unter Standardbedingungen schwach endergon sind, dennoch möglich.

4.1.1. Naphthochinone

Die isoprenoiden Chinone lassen sich in die zwei großen Gruppen der Benzo- und Naphthochinone einteilen (Nowicka & Kruk, 2010). Unterschieden werden sie in der Grundstruktur der Kopfgruppe. Benzochinone besitzen ein benzoides und Naphthochinone ein naphthoides Grundgerüst (Abb. 3).

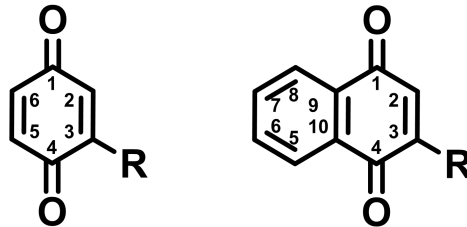


Abbildung 3 Struktureller Unterschied zwischen isoprenoiden Benzochinonen (links) und isoprenoiden Naphthochinonen (rechts) sowie deren Nummerierung der Kohlenstoffatome.

Die isoprenoiden Naphthochinone zählen zu den evolutionär älteren Chinonen und sind in allen drei Domänen des Lebens vertreten (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2013). Sie besitzen generell ein negativeres Redoxpotential als benzoide Chinone und kommen daher oft in fakultativ anaeroben oder strikt anaeroben Mikroorganismen vor (Nowicka & Kruk, 2010). Die Strukturen der wichtigsten in Organismen vorkommenden isoprenoiden Naphthochinone sind in Abbildung 4 dargestellt.

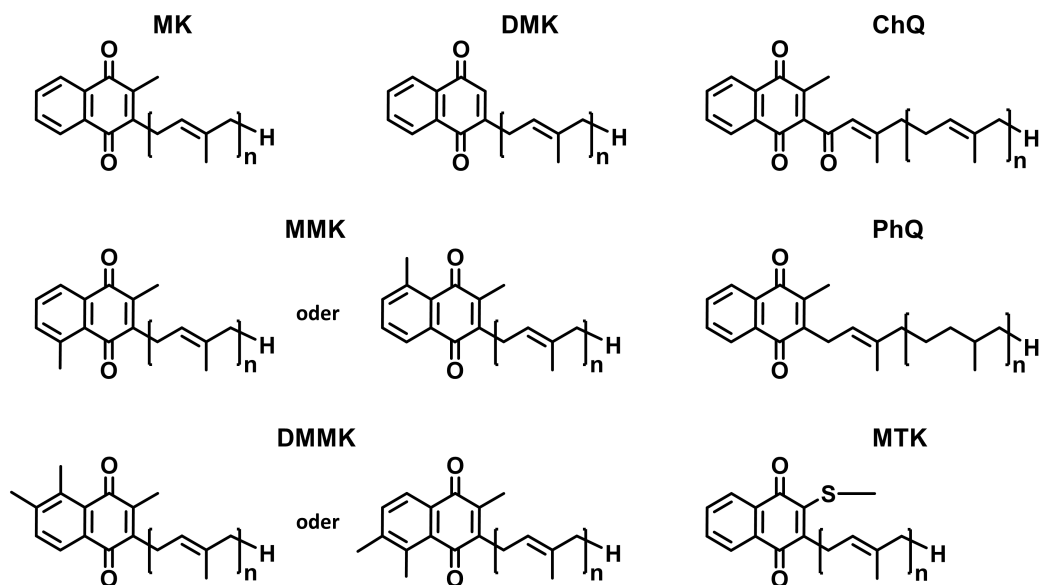


Abbildung 4 Struktur wichtiger isoprenoider Naphthochinone. MK: Menachinon; DMK: 2-Demethylmenachinon; ChQ: Chlorobiumchinon; PhQ: Phyllochinon; MMK: Methylmenachinon; DMMK: Dimethylmenachinon; MTK: Methionachinon. Verändert nach Nowicka & Kruk, 2010.

Phyllochinon und Chlorobiumchinon besitzen im Gegensatz zu den übrigen dargestellten Chinonen eine andere Seitenkette. Die isoprenoide Seitenkette von Chlorobiumchinon trägt am ersten Kohlenstoffatom eine zusätzliche Carbonylgruppe. Phyllochinon dagegen besitzt statt einer Prenyl-basierten Seitenkette eine Phytidyl-basierte Seitenkette. MTK ist in wenigen Gattungen wie *Thermoplasma*, *Hydrogenobacter* und *Aeropyrum* zu finden, wobei die Biosynthese der Methiogruppe bisher nicht aufgeklärt ist (Shimada *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 1991; Nishida *et al.*, 1999). 2-Demethylmenachinon (DMK) ist die Vorstufe von Menachinon. Die Methylierung an Position C-2 wird durch die Methyltransferase UbiE/MenG bzw. MqnJ katalysiert (Nowicka & Kruk, 2010; Joshi *et al.*, 2018). Neben dem DMK und MK wurden in einigen Mikroorganismen, wie z.B. *Adlercreutzia equolifaciens* und *Wolinella succinogenes* mono- und dimethylierte Varianten von MK beschrieben (Maruo *et al.*, 2008; Collins & Fernandez, 1984). Die exakte Position der Methylgruppe war zu Beginn dieser Arbeit nur für das Methylmenachinon-7 (Thermoplasmachinon) von *Thermoplasma acidophilum* und *Shewanella putrefaciens* an Position C-8 bestimmt (Shimada *et al.*, 2001; Itho *et al.*, 1985). Die Struktur von Dimethylmenachinon (DMMK) war dagegen unklar. Jedoch wurde durch NMR-Analysen gezeigt, dass beide Methylgruppen benachbart vorliegen (Collins *et al.*, 1985). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die beiden dargestellten Strukturen von 7,8-DMMK und 5,6-DMMK von Collins (1985) postuliert (Abb. 4). Da sich diese Arbeit mit der Methylierung von MK beschäftigt, wird im Folgenden die Biosynthese von Menachinon erläutert.

4.1.2. Biosynthese von Menachinon

Zwei unterschiedliche Biosynthesewege von Menachinon sind bekannt: der klassische Menachinon-Biosyntheseweg (Men) und der Fualosin-Biosyntheseweg (Mqn) (Dairi, 2012). Die Biosynthese startet in beiden Wegen mit Chorismat, einem zentralen Metaboliten des Shikimisäurewegs.

4.1.3. Der klassische Menachinon-Biosyntheseweg (Men)

Die Biosynthese über den Men-Weg erfolgt durch die neun Enzyme MenF, -D, -H, -C, -E, -B, -A, -G sowie YdiI (Nowicka & Kruk, 2010). Der Biosyntheseweg ist in Abbildung 5 dargestellt. MenF wandelt im ersten Schritt Chorismat zu Isochorismat um. In den weiteren Schritten wird Isochorismat durch die Enzyme MenD, -H, -C, -E, -B in 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat-CoA (DHNA-CoA) überführt. Lange Zeit wurde vermutet, dass MenH als Thioesterase fungiert und die Abspaltung von CoA vom DHNA-CoA katalysiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Esterase YdiI diesen Schritt übernimmt und MenH eine Rolle bei der Eliminierung eines C₃H₃O₃-Körpers von 2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexene-1-Carboxylsäure spielt (Nowicka & Kruk 2010).

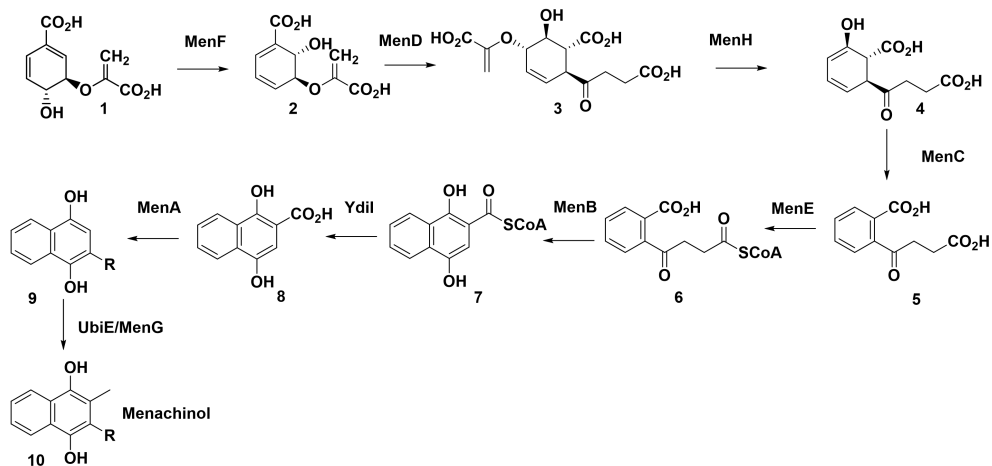


Abbildung 5 Schema des klassischen Menaquinon Biosynthesewegs. MenF: Isochorismat-Synthase; MenD: SEPHCHC-Synthase; MenH: SHCHC-Synthase; MenC: *o*-Succinylbenzoat-Synthase; MenE: *o*-Succinylbenzoat-CoA-Ligase; MenB: Naphthoat-Synthase; YdiI: 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Hydrolase; MenA: DHNA-Polyprenyltransferase; UbiE/MenG: Demethylmenaquinone-Methyltransferase; 1: Chorismat; 2: Isochorismat; 3: 2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexene-1-Carboxylsäure (SEPHCHC); 4: 2-Succinyl-6-Hydroxy-2,4-Cyclohexadiene-1-Carboxylsäure (SHCHC); 5: *o*-Succinylbenzoat (OSB); 6: *o*-Succinylbenzoat-CoA (OSB-CoA); 7: 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat-CoA (DHNA-CoA); 8: 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat (DHNA); 9: 2-Demethylmenaquinol (DMKH₂); 10: Menaquinon (MKH₂).

Nach der Abspaltung von CoA entsteht die Grundstruktur der Menaquinonkopfgruppe, das 2-DHNA. Durch die Kondensierung der Prenylseitenkette und die Decarboxylierung durch MenA bildet sich das bereits respiratorisch aktive membrangebundene DMK. Abschließend ist UbiE und/oder MenG in der Lage das DMK am C-Atom 2 zu methylieren, wodurch die Chinolform von MK entsteht. Der Men-Biosyntheseweg ist vornehmlich im Phylum Actinobacteria und der Klasse der Gamma Proteobacteria verbreitet (Nowicka & Kruk, 2010).

4.1.4. Der Fualosin-Biosyntheseweg (Mqn)

Im Gegensatz zum klassischen Menaquinon Biosynthese Weg, ist der Fualosin-Weg weit verbreitet (Zhi *et al.*, 2014). Er ist in den Gram-positiven Phyla Firmicutes und Actinobacteria, in unterschiedlichen Archaea sowie den Delta- und Epsilonproteobakterien zu finden (Zhi *et al.*, 2014). Zhi *et al.* (2014) fiel zudem auf, dass es derzeit keinen Organismus gibt, der im Genom den Fualosin-Weg und den Ubichinon-Biosyntheseweg kodiert. Aufgrund dieser weiten Verbreitung und dem Vorhandensein in den Archaea wird angenommen, dass der Fualosin-Weg gegenüber dem Men-Weg der evolutionär ältere Biosyntheseweg ist. An der Biosynthese von Menaquinon über den Fualosin-Biosyntheseweg sind die 10 Proteine MqnA, -E, -F, -B, -C, -D, -G, -H, -I, -J beteiligt. Wie im klassischen Men-Biosyntheseweg, beginnt der Mqn-Weg mit Chorismat (Abb. 6).

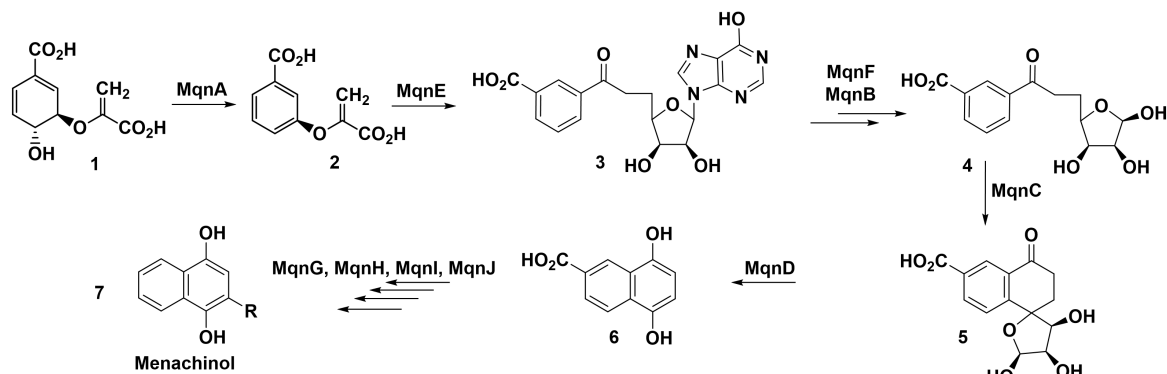


Abbildung 6 Schema des Futalosin-Biosynthesewegs. MqnA: Chorismat-Dehydratase; MqnE: 6-Aminodeoxyfutalosin-Synthase; MqnF: 6-Aminodeoxyfutalosin-Deaminase; MqnB: Futalosin-Hydrolase; MqnC: Dehypoxanthinylfutalosin-Cyclase; MqnD: 1,4-Dihydroxy-6-Naphthoate-Synthase; MqnG: 1,4-Dihydroxy-6-Naphthoate-Decarboxylase Untereinheit A; MqnH: 1,4-Dihydroxy-6-Naphthoate-Decarboxylase Untereinheit B; MqnI: 1,4-Naphthochinon-Prenyltransferase; MqnJ: Demethylmenachinon-Methyltransferase; 1: Chorismat; 2: 3-[(1-carboxyvinyl)-oxy]benzoesäure; 3: 6-Aminodeoxyfutalosin; 4: Dehypoxanthinylfutalosin; 5: Zyklisches Dehypoxanthinylfutalosin; 6: 1,4-Dihydroxy-6-Naphthoat; 7: Menachinol (MKH₂).

Das Chorismat wird durch MqnA dehydriert und anschließend vom radikalischen SAM Enzym MqnE genutzt, um mit einem 5-Ado Radikal 6-Aminodeoxyfutalosin zu bilden. Über die Enzyme MqnF, -B, -C, -D wird 6-DHNA synthetisiert, einem zum 2-DHNA im Men-Biosyntheseweg ähnlichen Molekül. Die letzten Schritte des Biosynthesewegs sind bisher nicht eindeutig aufgeklärt, jedoch wurde postuliert, dass die Proteine MqnG, -H und -I an der Decarboxylierung und der Prenylierung von 2-DHNA beteiligt sind (Hiratsuka *et al.*, 2008). MqnJ ist homolog zu MenG/UbiE und damit vermutlich für die Methylierung des Ubichinons an C-2 verantwortlich.

4.2. Chinonbiosynthese in *Wolinella succinogenes*

W. succinogenes zählt zur Klasse der Epsilonproteobakterien, wenngleich jüngst eine Reklassifizierung in das Phylum Campylobacterota vorgeschlagen wurde (Waite *et al.*, 2018). Es ist nicht fermentativ und zeigt im Gegensatz zu seinen nahen Verwandten wie *Campylobacter jejuni* oder *Helicobacter pylori* nach dem heutigen Stand der Forschung keine Pathogenität gegenüber anderen Lebewesen. *W. succinogenes* ist in der Lage die Elektronendonoren Formiat und Wasserstoff zu nutzen und mit diesen ein breites Spektrum an Elektronenakzeptoren (Nitrat, Nitrit, Distickstoffmonoxid, Fumarat, Sulfit, Polysulfid, DMSO und Sauerstoff) zu reduzieren (Bokranz *et al.*, 1983; Lorenzen *et al.*, 1994; Hedderich *et al.*, 1999; Kröger *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2016). Aufgrund der leichten Kultivierbarkeit, der genetischen Zugänglichkeit und des schnellen nicht-fermentativen Wachstums gilt

W. succinogenes als Modellorganismus für die anaerobe Atmung. Für die Atmungsprozesse produziert *W. succinogenes* als Hauptchinon Menachinon-6 über den Fualosin-Biosyntheseweg. Die Gene des Biosynthesewegs wurden im Vorfeld dieser Arbeit über bioinformatische Analysen identifiziert (Tab. 1) (Hein *et al.*, 2017a).

Tabelle 1 Die genetische Ausstattung für den postulierten Fualosin-Weg der MK-Biogenese in *W. succinogenes*.

Gen ¹	Abkürzung ²	BLAST E-value ³	
		<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
<i>Ws0245</i>	<i>mqnA</i>	5 e ⁻⁵⁴ ; Cj1285c	7 e ⁻⁷ ; SCO4506
<i>Ws2177</i>	<i>mqnE</i>	9 e ⁻¹⁷⁷ ; Cj1368	7 e ⁻⁸⁶ ; SCO4494
<i>Ws1477</i>	<i>mqnF</i>	1 e ⁻⁸⁸ ; Cj0067	6 e ⁻¹⁶ ; SCO1984
<i>Ws0528</i>	<i>mqnB</i>	3 e ⁻⁹³ ; Cj0117	2 e ⁻⁴ ; SCO4327
<i>Ws0351</i>	<i>mqnC</i>	0; Cj0462	3 e ⁻¹⁰² ; SCO4550
<i>Ws1492</i>	<i>mqnD</i>	9 e ⁻¹⁴¹ ; Cj1674	8 e ⁻²⁵ ; SCO4326
<i>Ws1540</i>	<u><i>mqnG</i></u>	0; Cj0546	1 e ⁻¹⁰⁸ ; SCO4490
<i>Ws0611</i>	<u><i>mqnH</i></u>	2 e ⁻⁴⁶ ; Cj0768c	7 e ⁻²⁴ ; SCO4492
<i>Ws0357</i>	<u><i>mqnI</i></u>	6 e ⁻⁸⁸ ; Cj0164c	6 e ⁻⁴⁸ ; SCO4491
<i>Ws1220</i>	<u><i>mqnJ</i></u>	9 e ⁻⁹² ; Cj0324	1 e ⁻³⁴ ; SCO4556

¹ Geordnet nach der Menachinon-Biosynthese (Abb. 10).

² Radikale SAM Enzyme sind fett hervorgehoben. Hypothetische *mqn*-Gene sind unterstrichen. Die Reihenfolge der von MqnG, MqnH, MqnI und MqnJ katalysierten Reaktionen wurde bisher nicht aufgeklärt.

³ In Bezug auf die homologen Gene (Lokus-Tag) von *C. jejuni* NCTC 11168 or *S. coelicolor* A3(2).

Für MqnJ aus *W. succinogenes* konnte Dr. Melanie Kern eine Methyltransferase-Aktivität *in vivo* nachweisen, indem sie das MqnJ Protein in dem UbiE-defizienten *E. coli* Stamm AN70 produzierte (M. Kern und J. Simon, nicht veröffentlicht). Nach der Produktion von MqnJ konnte ebenfalls Menachinon nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Methylierung von DMK im Fualosinbiosyntheseweg wie auch im Men-Weg im letzten Schritt der Menachinon Biosynthese durchgeführt wird. Eine Deletion von *mqnJ* in *W. succinogenes* war nicht möglich, was darauf hindeutet, dass dieses Gen essentiell ist. Neben MK₆ ist *W. succinogenes* in der Lage Methylmenachinon-6 zu produzieren. Die Funktion von MMK₆ wurde von Dietrich & Klimmek (2002) näher beleuchtet. Sie rekonstituierten gereinigte Formiat-Dehydrogenase und Polysulfid-Reduktase in Lipsomen und ermittelten die Elektronentransportaktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Chinon (MK₆ bzw. MMK₆). Durch den Einsatz von MMK₆ in den Lipsomen, konnten sie eine direkte Elektronenübertragung auf Polysulfid nachweisen (Details sind der Diskussion, Kap. 9.4.2, zu entnehmen). Dieses Ergebnis impliziert, dass MMK₆ als Elektronenmediator zwischen Elektronendonoren und Elektronakzeptoren fungiert, wenn beide ein vergleichsweise negatives Redoxpotential haben (Abb. 2).

4.2.1. Biosynthese von MMK₆ in *Wolinella succinogenes*

Das Gen *ws0113* wurde durch die systematische Deletion von putativen Methyltransferasen in *W. succinogenes* als mögliche Menachinon-Methyltransferase identifiziert (Hein *et al.*, 2017a). Das Gen *ws0113* wird im Folgenden als *mqnK* bezeichnet. Das *mqnK*-Gen liegt unmittelbar stromaufwärts des Polysulfidreduktase-Operons und wurde in Vorarbeiten zu dieser Arbeit durch Dr. Melanie Kern deletiert (Abb. 7). Die daraus hervorgegangene Deletionsmutante war nicht in der Lage Methylmenachinon-6 zu produzieren. Für die Komplementation der Deletionsmutante wurde das *mqnK* Gen mit seinem nativen Promotor in eines der drei sequenzidentischen rRNA Gen-Cluster eingeführt. Dadurch wurde die Bildung von MMK₆ restauriert (Abb. 7). Aus unbekanntem Grund war dabei das MMK₆:MK₆-Verhältnis zugunsten von MMK₆ verschoben. (Abb. 7).

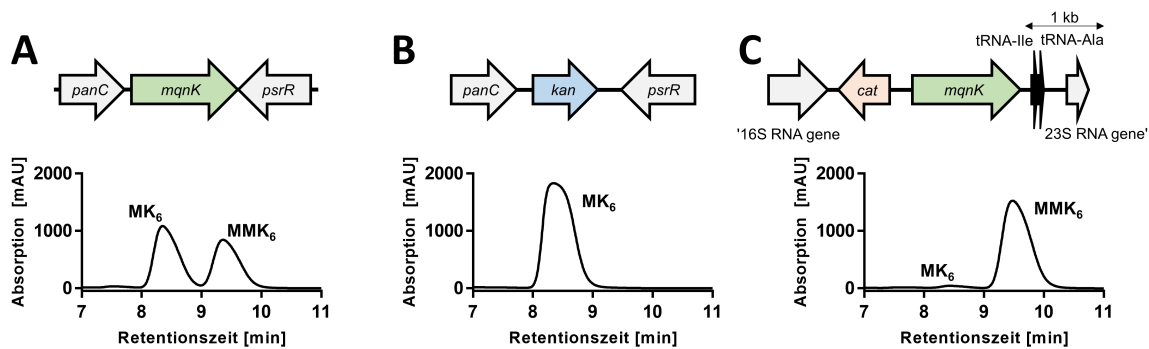


Abbildung 7 Genetische Karten des *mqnK*-Lokus in Zellen des Wildstammes von *W. succinogenes* DSM 1740 und Mutantenzellen, sowie die korrespondierenden HPLC-Chromatogramme der isolierten Chinone. (A), *mqnK*-Genlokus und Chinonprofil von *W. succinogenes* DSM 1740 mit den beiden Chinonen MK₆ und MMK₆. (B), *mqnK*-Genlokus und Chinonprofil von *W. succinogenes* $\Delta mqnK$. Nach der Deletion von *mqnK* wurde kein MMK₆ in der Membran mittels HPLC detektiert. (C), *mqnK*-Genlokus und Chinonprofil von *W. succinogenes* $\Delta mqnK::kan$ RecovrD-for-*mqnK cat*. Nach der Komplementation von *mqnK* in *W. succinogenes* $\Delta mqnK$ ist MMK₆ in der Membran wieder nachweisbar. Die Kulturen wurden jeweils auf Formiat/Fumarat-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Chinone isoliert und mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme ($n=3$). Verändert nach Hein *et al.* 2017a.

Durch bioinformatische Analysen wurde das Genprodukt von *mqnK* aufgrund des Vorhandenseins der HemN-Domäne und des konservierten C_{xxx}C_{xx}C Motivs in die Klasse C der radikalischen S-Adenosylmethionin Methyltransferasen eingeordnet (Hein *et al.*, 2017a).

4.3. Die Superfamilie der radikalischen S-Adenosylmethionin Enzyme

S-Adenosylmethionin (SAM) gilt in biologischen Systemen als der wichtigste Methylgruppendonator und Radikalinitiator in enzymatischen Reaktionen (Catanoni, 1975; Broderick *et al.*, 2014). Durch SAM-abhängige Methyltransferasen wird die Methylgruppe des Sulfoniumions auf eine Vielzahl von Molekülen, wie Proteine, DNA, RNA oder kleine Moleküle übertragen (Abb. 8)(Mato *et al.*, 1997).

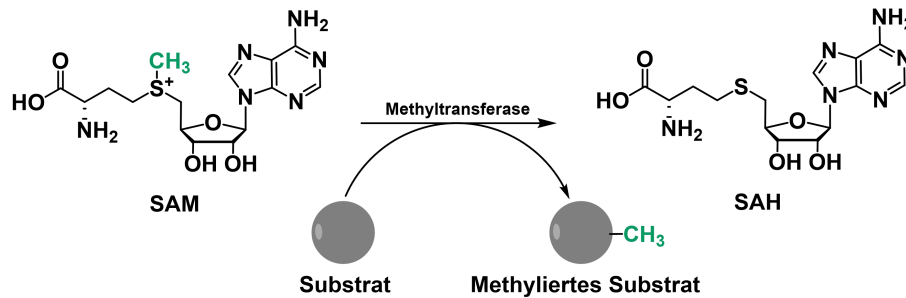


Abbildung 8 Generelle Methylierung eines Substrats durch eine SAM-abhängige Methyltransferase. Die Methyltransferase überträgt die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf ein geeignetes Substrat, wodurch S-Adenosylhomocystein (SAH) entsteht.

SAM gilt *in vivo* als auch *in vitro* als sehr instabil und zerfällt bei einem pH-Wert über 1,8 oder bei hohen Temperaturen in Homoserinlaktat (HSL) und Methylthioadenosin (MTA) (Farooqui *et al.*, 1983). Klassische SAM-abhängige Methyltransferasen transferieren die Methylgruppe über einen S_N2-ähnlichen Reaktionsmechanismus auf Sauerstoff-, Stickstoff- oder nukleophile Kohlenstoffatome. Neben dieser Gruppe der Methyltransferasen, gibt es in der Superfamilie der radikalischen SAM Enzyme eine Familie der radikalischen SAM Methyltransferasen, die in der Lage sind die Methylgruppe auf nichtreaktive Kohlenstoffatome zu transferieren (Bauerle *et al.*, 2015).

In der radikalischen S-Adenosylmethionin Enzym-Superfamilie sind mehr als 590.480 Proteine bekannt (Holliday *et al.*, 2018). Ein Großteil der Reaktionen, die diese Enzyme katalysieren gilt bis heute als unbekannt. Charakteristisch für alle diese Proteine ist das redoxaktive [4Fe 4S] Cluster im aktiven Zentrum (Broderick *et al.*, 2014). Strukturell zeigt das aktive Zentrum ein sogenanntes β₈α₈ TIM-Barrel Motiv (Wang *et al.*, 2014). Die TIM-Barrel Struktur mit dem konservierten C_{xxx}C_{xx}C Motiv, welches das [4Fe-4S]-Zentrum ligandiert, wird auch als radikalische S-Adenosylmethionin Domäne bezeichnet. Durch die Fusion weiterer Domänen ist in der Natur eine große Diversität an Proteinen entstanden, die die unterschiedlichsten Reaktionen katalysieren können (Broderick *et al.*, 2014). Da die radikalische S-Adenosylmethionin Domäne in all diesen Proteinen stark konserviert ist, wird sie auch als

Plug and Play-Domäne bezeichnet (Holliday *et al.*, 2018). Allen radikalischen SAM-Enzymen gemein ist die Bindung eines SAM-Moleküls am [4Fe-4S]-Zentrum. Durch die Aufnahme eines Elektrons von einem externen Elektronendonator wie Flavodoxin oder Ferredoxin wird das Eisen-Schwefel-Zentrum vom $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand in den $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zustand überführt (Layer *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014). In diesem Zustand ist das $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrum in der Lage, mit dem aufgenommenen Elektron einen Bindungsbruch im SAM-Molekül zu katalysieren, wodurch ein 5'-Desoxyadenosyl-Radikal (5-Ado-Radikal) initiiert wird (Abb. 9).

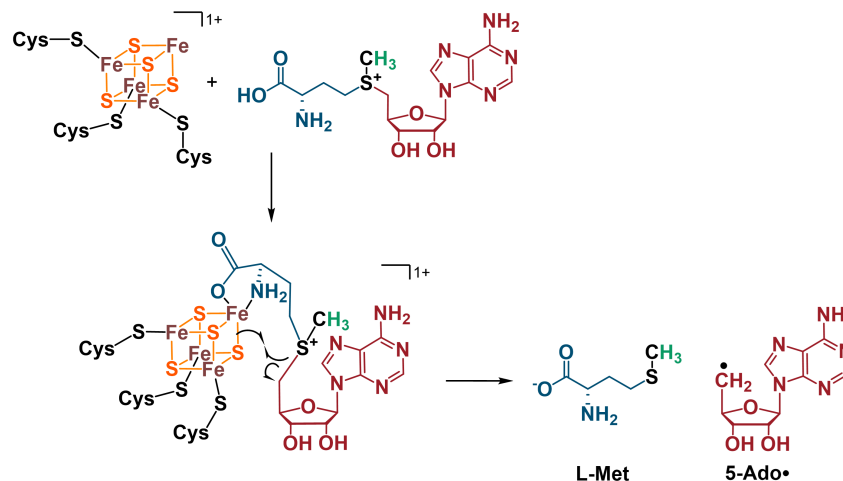


Abbildung 9 Schema der Bildung des 5-Ado-Radikals durch das Eisen-Schwefel-Zentrum der radikalischen SAM Enzyme.

Dieses 5'-Desoxyadenosyl-Radikal kann je nach radikalischem SAM-Protein auf ein geeignetes Substrat übertragen werden, wodurch unterschiedliche Reaktionen stattfinden können. Die bekanntesten Reaktionen der radikalischen SAM-Proteine sind der Schwefel-Transfer in der Biotinsynthese durch das Protein BioB, die Decarboxylierung der Häm-Vorstufe Coproporphyrinogen III durch das Protein HemN, die Bildung der Thioether-Brücke im Subtilosin durch das Protein AlbA und die Methylierung von rRNA durch das Enzym RlmN (Wang *et al.*, 2007; Broderick *et al.*, 2014). Da sich diese Arbeit mit der Methylierung von Menachinon auseinandersetzt, wird im Folgenden die Familie der radikalischen S-Adenosylmethionin-Methyltransferasen näher beschrieben.

4.3.1. Radikalische *S*-Adenosylmethionin-Methyltransferasen

Die Gemeinsamkeit aller radikalischen *S*-Adenosylmethionin-Methyltransferasen (RSMTs) ist die Methylierung von nicht-reaktiven Kohlenstoff- oder Phosphoratomen (Bauerle *et al.*, 2015). Jedoch ist weder der Reaktionsmechanismus noch der Methylgruppendifferenz für das Substrat in diesen Proteinen konserviert. Basierend auf der Architektur der Proteine und dem genutzten Methylgruppendifferenz werden die RSMTs in derzeit fünf Klassen (A-E) unterteilt (Abb. 10) (Bauerle *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016).

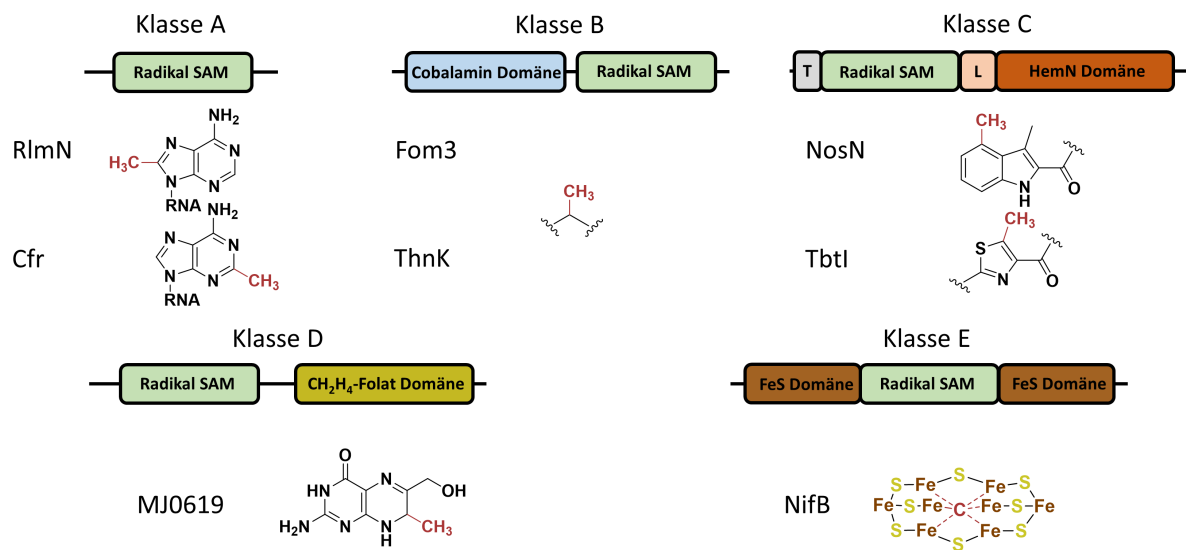


Abbildung 10 Die fünf Klassen der radikalischen SAM-Methyltransferasen mit der zugehörigen Domänenanordnung und typischen Beispielen. Rot: Transferierte Methylgruppen/Kohlenstoffatome. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. RlmN: C-2 RNA Methyltransferase; Cfr: C-8 Methyltransferase; Fom3: 2-Hydroxyethylphosphonat Methyltransferase; ThnK: Thienamycin Methyltransferase; NosN: Nosiheptid Methyltransferase; TbtI: Thiazole Methyltransferase; MJ0619: 6-Hydroxymethyl-Dihydropterin Methyltransferase; NifB: K-Zentrum Methyltransferase; T: „Trip-wire“-Abschnitt; L: Linker-Abschnitt.

Die Klasse A besitzt nur die radikalische SAM-Domäne in der zwei zusätzliche konservierte Cysteinreste an der Katalyse beteiligt sind und als direkter Methylgruppendifferenz für das Substrat dienen (Grove *et al.*, 2011). Klasse A RSMTs transferieren in der Regel die Methylgruppe auf ein sp^2 -hybridisiertes Kohlenstoffatom (Bauerle *et al.*, 2015). Die am besten untersuchten Enzyme sind RlmN und Cfr. Beide spielen bei der Methylierung von rRNA eine essentielle Rolle. Die Klasse B RSMTs spielen dagegen eher bei der Methylierung von Sekundärmetaboliten (z.B. Antibiotika wie Bialaphos, Gentamycin und Fosfomycin) eine entscheidende Rolle und sind in der Lage neben sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen auch sp^3 -hybridisierte C-Atome und das Phosphoratom in Phosphinaten zu methylieren (Bauerle *et al.*, 2015). Als Methylgruppendifferenz dient hier ein Cobalamin Kofaktor, welcher in

der für die Klasse B charakteristischen Cobalamin Bindedomäne ligandiert wird. Aus der Klasse D und Klasse E ist derzeit jeweils nur ein Protein bekannt (Allen *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2016). Das Protein MJ0619 ist an der Methanopterin-Biosynthese beteiligt und katalysiert die Methylierung von 6-Hydroxymethyl-Dihydropterin an dem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatom an Position 7 (Allen *et al.*, 2014). Beteiligt daran ist ein Tetrahydrofolat-Kofaktor, welcher als Methylgruppendonor fungiert. Die Klasse E stellt eine besondere Methyltransferase dar, da hier lediglich das Kohlenstoffatom der Methylgruppe in zwei sogenannte K-Zentren der Nitrogenase eingebaut wird, wodurch das sogenannte L-Zentrum als Vorstufe des M-Zentrums entsteht (Hu *et al.*, 2016; Rettberg *et al.*, 2018). Das zugehörige NifB-Protein besitzt zum Einbau des Kohlenstoffatoms in die Zentren zwei zusätzliche Domänen zur Bindung dieser K-Zentren. Im aktuellen Modell der Katalyse sind zwei SAM beteiligt, wobei eines der beiden der direkte Methylgruppendonor ist. Das zweite SAM ist zur Generierung des Radikals notwendig. Wie in der Klasse E wird auch in der Klasse C kein weiterer Kofaktor für die Methylierung benötigt. Der Methylgruppendonor ist hier ebenfalls wie in der Klasse E das SAM direkt. Aus der Literatur und der Kristallstruktur der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase HemN, eines zu den RSMTs Klasse C homologen Proteins, ist bekannt, dass die Klasse C RSMT zwei SAM Moleküle bindet (Layer *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2017a; Zhang *et al.*, 2017). Im Beispiel von TbtI wurde für die Klasse C RSMT im ersten Schritt eine Generierung eines Methylenradikals durch den Transfer des Radikals von 5-Ado auf die Methylgruppe vom SAM postuliert (Abb. 11) (Zhang *et al.*, 2017).

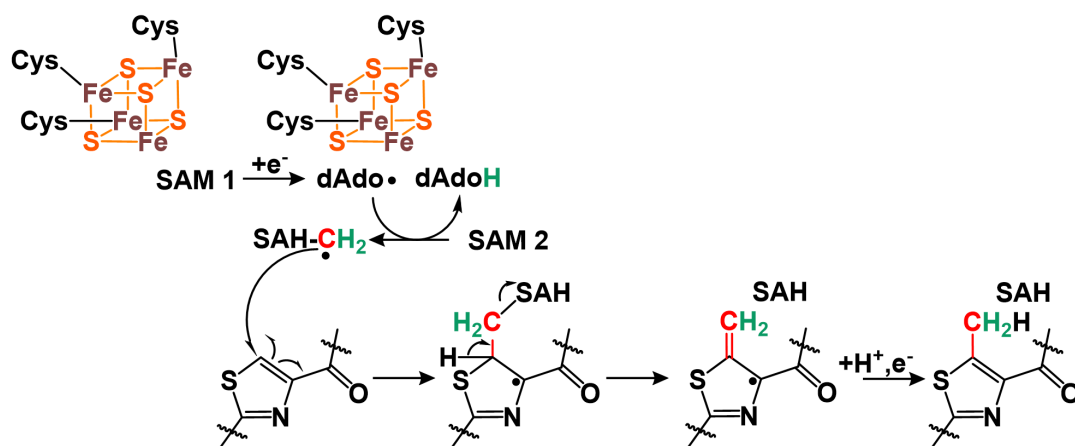


Abbildung 11 Vereinfachter Reaktionsmechanismus für das Protein TbtI der Klasse C RSMT. Verändert nach Zhang *et al.*, 2017.

Im Anschluss wird dieses Methylenradikal auf das Substrat übertragen, wodurch SAH und das methylierte Produkt entsteht. Die Übertragung dieses Methylenradikals konnte für die Klasse C RSMT Enzyme TbtI, NosN und C10P in Experimenten mit Deuterium-markierten Substraten nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2017a; Jin *et al.*, 2018).

Ein weiteres Charakteristikum ist die sogenannte HemN-Domäne am C-Terminus in den Klasse C RSMT-Enzymen (Layer *et al.*, 2005; Bauerle *et al.*, 2015). Diese zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zum N-Terminus der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase HemN, welche keine Methyltransferase ist, sondern ein RS-Enzym, das die Decarboxylierung und damit die Generierung der Vinyl-Gruppen an der Häm-Vorstufe Coproporphyrinogen III katalysiert (Layer *et al.*, 2002).

5. Ziele der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung und Entstehung von methylierten Menachinonen näher zu untersuchen. Daraus wurden vier Unterziele abgeleitet. Jedem dieser Unterziele wurde ein separates Kapitel gewidmet:

Strukturen und Redoxpotentiale methylierter Menachinon-Derivate

Ziel des ersten Kapitels war die Identifizierung der Position der Methylgruppen von MMK₆ aus *W. succinogenes* und DMMK₆ aus *A. equolifaciens*. Des Weiteren sollten die Redoxpotentiale der Chinone durch zyklische Voltammetrie bestimmt und miteinander verglichen werden.

Biosynthese der methylierten Menachinon-Derivate

Zur weiteren Untersuchung der Methylmenachinon-Biosynthese sollten die Menachinon-Methyltransferase-Gene aus den Organismen *W. succinogenes* DSM 1740, *A. equolifaciens* DSM 19540 und *Shewanella oneidensis* MR-1 in diversen *Escherichia coli* Stämmen exprimiert und die resultierende Chinonkomposition analysiert werden. Des Weiteren sollte die Biosynthese von DMMK in *A. equolifaciens* DSM 19540 näher untersucht und die verantwortlichen Gene identifiziert werden. Nach der Identifizierung der Gene sollte die Funktion der entsprechenden Genprodukte in *E. coli* und *W. succinogenes* charakterisiert werden.

Funktion von MMK und Regulation des MMK-Gehalts

Neben der Biosynthese von MMK sollte in *W. succinogenes* und in *S. oneidensis* der Einfluss von verschiedenen Elektronenakzeptoren auf den MMK-Gehalt in der Membran dieser Organismen untersucht werden. Des Weiteren sollte die Bedeutung von MMK in der Sulfid-Atmung charakterisiert werden.

Biochemische Charakterisierung der Menachinon-Methyltransferasen

Nach der *in vivo* Charakterisierung sollte eine Menachinon-Methyltransferase ausgewählt werden, die heterolog produziert und gereinigt werden sollte. Die biochemische Charakterisierung der gereinigten Menachinon-Methyltransferase sollte die Zugehörigkeit des Proteins in die Klasse C der RSMTs bestätigen. Des Weiteren sollte ein Enzymtest für die *in vitro* Methylierung von Menachinon etabliert werden, um den Reaktionsmechanismus der Menachinon-Methyltransferase aufzuklären.

6. Material und Methoden

6.1. Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien und Geräte sind im Anhang in den Tabellen 18 und 19 aufgeführt.

6.2. Medien, Spurenelemente, Antibiotika und Kultivierung von Mikroorganismen

6.2.1. Nährmedien und Supplemente für die Kultivierung von *Wolinella succinogenes*

Für die Kultivierung von *W. succinogenes* wurden die nachfolgend beschriebenen Medien genutzt. Das Flüssigmedium bzw. der Agar wurden vor dem Autoklavieren durch alternierendes Entgasen mittels Vakuumpumpe und Begasen mit elementarem Stickstoff anaerobisiert. Wenn nötig wurden nach dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C und 2 bar) die Antibiotika in den entsprechenden Endkonzentrationen (25 µg/ml Kanamycin und 12,5 µg/ml Chloramphenicol) zugegeben.

Formiat/Fumarat-Medium

10 % (v/v) Formiat/Fumarat Konzentrat
0,1 % (v/v) Calcium/Magnesium Lsg.
0,5 % (w/v) Brain Heart Infusion Medium

Formiat/Nitrat-Medium

5 % (v/v) Formiat/Nitrat Konzentrat
0,1 % (v/v) Calcium/Magnesium Lsg.
0,5 % (w/v) Brain Heart Infusion Broth
1 % (v/v) Cystein/Glutamat Konzentrat

Formiat/Sulfit-Medium

5 % (v/v) Minus Donor Konzentrat
0,1 % (v/v) Calcium/Magnesium Lsg.
0,5 % (w/v) Brain Heart Infusion Broth
1 % (v/v) 1 M Natriumsulfit Lösung

Formiat/Fumarat-Agar

10 % (v/v) Formiat/Fumarat Konzentrat
0,1 % (v/v) Calcium/Magnesium Lsg.
2,6 % (w/v) Brain Heart Infusion Agar

Formiat/Fumarat/Sulfit-Medium

10 % (v/v) Formiat/45 mM Fum. Konz.
0,1 % (v/v) Calcium/Magnesium Lsg.
0,5 % (w/v) Brain Heart Infusion Broth
1 % (v/v) 1 M Natriumsulfit Lösung

Formiat/N₂O-Medium

5 % (v/v) N₂O-Basis Konzentrat
0,1 % (v/v) Calcium/Magnesium Lsg.
0,5 % (w/v) Brain Heart Infusion Broth
1 % (v/v) Cystein/Glutamat Konzentrat

Für die Kultivierung mit N₂O als Elektronenakzeptor wurde vor der Inokulation die N₂-Gasphase gegen N₂O ersetzt. Bei der Kultivierung mit den Elektronenakzeptoren Sulfit wurde das Sulfit unmittelbar vor der Kultivierung steril und anaerob hinzugegeben.

10-fach Formiat/Fumarat Konzentrat

0,5 M Tris/HCl, pH 8,0
0,9 M Fumarsäure
1 M Natriumformiat
0,2 M di-Kaliumhydrogenphosphat
50 mM Ammoniumsulfat
50 mM Ammoniumchlorid
10 mM Glutaminsäure
0,2 M Natriumacetat
2 M Kaliumhydroxid
2 % (v/v) Spurenelementelösung SL8

20-fach Formiat/Nitrat Konzentrat

1 M Tris/HCl, pH 8,0
2 M Natriumformiat
0,02 M di-Kaliumhydrogenphosphat
0,1 M Fumarsäure
0,1 M Ammoniumsulfat
1 M Kaliumnitrat
2 % (v/v) Spurenelementelösung SL8

10-fach Formiat/45 mM Fumarat Konzentrat

0,5 M Tris/HCl, pH 8,0
0,45 M Fumarsäure
1 M Natriumformiat
0,2 M di-Kaliumhydrogenphosphat
50 mM Ammoniumsulfat
50 mM Ammoniumchlorid
10 mM Glutaminsäure
0,2 M Natriumacetat
2 M Kaliumhydroxid
2 % (v/v) Spurenelementelösung SL8

Spurenelementelösung SL8

5,2 g/l Na₂EDTA x 2 H₂O
1,5 g/l FeCl₂ x 4 H₂O
0,07 g/l ZnCl₂
0,1 g/l MnCl₂ x H₂O
0,062 g/l B(OH)₃
0,19 g/l CoCl₂ x 6 H₂O
0,017 g/l CuCl₂ x 2 H₂O
0,024 g/l NiCl₂ x 6 H₂O
0,036 g/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O

20-fach Minus Donor-/ N₂O-Konzentrat

1 M Tris/HCl, pH 8,0
2 M Natriumformiat
0,02 M di-Kaliumhydrogenphosphat
0,1 M Fumarsäure
0,1 M Ammoniumsulfat
1 M Kaliumnitrat
2 % (v/v) Spurenelementelösung SL8

1.000x Calcium/Magnesium Lösung

0,74 g (w/v) Calciumchlorid Dihydrat
5,1 g (w/v) Magnesiumchlorid Hexahydrat

6.2.2. Nährmedien für die Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet.

LB-Medium (Lennox)

20 g LB-Fertigmedium wurden in 1 l bidest. Wasser gelöst und 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Bei Bedarf wurden dem Medium vor dem Beimpfen Antibiotika zugesetzt.

LB-Agar (Lennox)

35 g LB-Agar-Fertigmedium wurden in 1 l bidest. Wasser gelöst und 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Falls nötig, wurde der Agar auf 45 °C abgekühlt und mit den jeweiligen Antibiotika versetzt.

TB-Medium

50,3 g TB-Fertigmedium wurden mit 4 ml Glycerin in 1 l bidest. Wasser gelöst und 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Falls nötig, wurden dem Medium vor dem Beimpfen noch Antibiotika zugesetzt.

6.2.3. Nährmedium für die Kultivierung von *Adlercreutzia equolifaciens*

Für die Anzucht von *A. equolifaciens* wurde 33 g Wilkins-Chalgren Medium (Oxoid CM0643) in 1 l bidest. Wasser gelöst und mit 0,5 ml Na-Resazurin Lösung (0,1 % (w/v)) versetzt.

Das Medium wurde 20 min in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend im anaeroben Zelt (0 ppm O₂) abgekühlt. 0,3 g L-Cysteine-HCl x H₂O und 1 g L-Arginin wurden dem Medium hinzugesetzt und unter anoxischer Atmosphäre in Hungates oder Serumflaschen gefüllt. Das Medium wurde 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

6.2.4. Nährmedium für die Kultivierung von *Shewanella oneidensis*

Shewanella oneidensis wurde in M4 Medium mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren (Sauerstoff, Nitrat und Fumarat) kultiviert (Beg *et al.*, 2012). Als Elektronendonator diente jeweils Laktat. Im Falle von Nitrat und Fumarat wurde das Medium zusätzlich mit 2 mM KNO₃ oder 20 mM Fumarat versetzt und anschließend durch alternierendes Be- und Entgasen (s. Kap. 6.2.1) in Serumflaschen anaerobisiert. Im Anschluss wurde das Medium 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Für die Kultivierung mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor wurden 50 ml Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben angesetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 4,3 ml/l 40 %ige Laktatlösung hinzugegeben.

M4 -Medium

10 % (v/v) M4 Konzentrat
1 % (v/v) Calcium Chlorid-Lösung
1 % (v/v) Spurenelementelösung SL10
0,05 % (w/v) Hefeextrakt
0,05 % (w/v) Trypton
0,43 % Laktat-Stammlösung

Erst nach dem Autoklavieren
hinzugeben

Spurenelementelösung SL10	Konzentration [mg/l]	10-fach M4 Konzentrat	Konzentration [g/l]
Na ₂ EDTA	2500	K ₂ HPO ₄	2,21
Mangan(II)sulfat-1-hydrat	21,3	KH ₂ PO ₄	0,99
NaCl	58,4	NaHCO ₃	1,68
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	107,4	(NH ₄) ₂ SO ₄	11,89
CoCl ₂	119	NaCl	73,05
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	30	Hepes	11,92
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	5		
H ₃ BO ₃	351	100-fach CaCl₂-Lösung	
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	93,6	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	7,13 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	119		
Na ₂ SeO ₄	28,3		

6.2.5. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde mittels photometrischer Messung (Spectrophotometer GENESYSTTM 10S UV-VIS, Thermo Scientific) der optischen Dichte bei 600 nm (für *E. coli*, *S. oneidensis* und *A. equifaciens*-Zellen) und 578 nm (für *W. succinogenes*-Zellen) ermittelt. Allen Werten wurde der Leerwert (Medium) abgezogen.

6.2.6. Antibiotika

Alle Antibiotika wurden sterilfiltriert und anschließend unter Ausschluss von Licht bei -20 °C oder im Fall von Chloramphenicol und Kanamycinsulfat bei 4 °C gelagert. Folgende Antibiotika wurden für die Selektion von Transformanten genutzt.

Tabelle 2 Konzentration der in dieser Arbeit genutzten Antibiotika.

Komponenten	Konzentration
Ampicillin	100 g/l
Chloramphenicol	2,5 g/l
Kanamycinsulfat	5 g/l
Apramycin	50 g/l
Spectinomycin	50 g/l
Anhydrotetracyclin	2 g/l

6.3. Molekularbiologische Methoden

6.3.1. Isolierung von DNA

Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das kommerzielle Kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Elutionspuffer wurde durch bidest. Wasser ersetzt.

PCR Amplifikate

Wenn nach einer PCR mit dem Amplifikat weitergearbeitet wurde, wurde das PCR-Produkt mit dem PCR CleanUp™ Kit der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Der Elutionspuffer durch wurde bidest. Wasser ersetzt.

Genomische DNA

Bakterielle Genome wurden mit dem GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers isoliert. Der Elutionspuffer wurde durch bidest. Wasser ersetzt.

6.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Das Spektrophotometer DS- 11+ (DeNovix) wurde zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.3.3. Sequenzanalyse

Die DNA Sequenzierung nach Sanger wurde durch die Firma SeqLab-Microsynth (Göttingen) durchgeführt. Die Auswertung der .ab1-files wurde mit ABSequence-Scanner v1.0 und Clone Manager 9 durchgeführt.

6.3.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde die Elektrophorese genutzt. Mit dieser Methode ist es möglich, DNA Fragmente aufgrund ihrer Größe aufzutrennen.

Für größere DNA-Fragmente (ab 1 kb) wurden Agarosegele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8 % (w/v) verwendet. Kleinere Fragmente wurden mit einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetrennt. Zum Gießen der Gele wurde die Agarose abgewogen und in 1-fach TAE Puffer suspendiert. Die Suspension wurde solange in einer Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde auf ca. 40 °C herabgekühlt, in einen Gelschlitten gegossen und die Kämme wurden eingesetzt. Nach Erstarren der Lösung wurden die Kämme entfernt und das Gel wurde in die Gelapparatur gestellt. Das Gel wurde mit 1-fach TAE Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 6-fach Loading Dye versetzt und neben 5 µl der 2-log DNA Ladder (NEB Biolabs) in die Geltaschen gefüllt. Eine Spannung von 120 V wurde für ca. 40 min angelegt. Anschließend wurde das Gel für 10 min im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) inkubiert und anschließend dokumentiert.

6-fach Loading Dye

30 % Glycerin
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylene Cyanol
0,25 % (w/v) Organe G

50-fach TAE Puffer

2 M Tris; pH 7,8
25 mM Natriumacetat
0,5 mM EDTA

6.3.5. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Amplifikation von DNA-Fragmenten

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten und Genen, die zur Erstellung von Deletionskassetten, Plasmiden oder zur Sequenzierung benötigt wurden, wurde die PCR mit der High-Fidelity Q5 Polymerase (NEB; Ipswich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein typischer PCR Ansatz sah wie folgt aus:

Tabelle 3 Pipettierschema der PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.

Komponenten	Volumina
DNA Templat	Variabel
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM Forward Primer	2 µl
10 µM Reverse Primer	2 µl
5x Q5 Puffer	5 µl
Q5 DNA Polymerase	1 µl
Bidest. Wasser	var.
	Add. 50 µl

Zur Amplifikation wurde standardmäßig folgendes Programm genutzt. Gegebenenfalls wurde die Annealing-Temperatur den Primern angepasst.

Tabelle 4 Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.

Name	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	98 °C	30 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	10 s	
Annealing	55 °C	30 s	
Extension	72 °C	15 s/kb	
Finale Extension	72 °C	5 min	

Kolonie-PCR (cPCR)

Zur schnellen Überprüfung von Transformanden wurde die Kolonie-PCR genutzt. Hierfür diente ein Teil der Kolonie direkt als Templat und wurde in den Mastermix gegeben. Die PCR wurde mit der OneTaq Polymerase (NEB, Ipswich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Folgenden ist das Ansatzschema gezeigt.

Tabelle 5 Pipettierschema der PCR zum Screen von Transformanden.

Komponenten	Volumina
Kolonie	-
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM Forward Primer	0,5 µl
10 µM Reverse Primer	0,5 µl
10x OneTaq Puffer	2,5 µl
OneTaq DNA Polymerase	0,125 µl
Bidest. Wasser	var.
	Add. 25 µl

Zur Amplifikation wurde standardmäßig folgendes Programm genutzt. Gegebenenfalls wurde die Annealing-Temperatur den Primern angepasst.

Tabelle 6 Temperaturprofil der PCR zum Screen von Transformanden.

Name	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing	55 °C	30 s	
Extension	68 °C	1 min/kb	
Finale Extension	68 °C	5 min	

6.3.6. CPEC

Zur Verknüpfung zweier oder mehrerer DNA Fragmente wurde die CPEC-Methode angewandt (Quan *et al.*, 2011). Diese Methode beruht auf einer primerlosen PCR. Die Fragmente werden in getrennten PCR Reaktionen zuvor so amplifiziert, dass sie zueinander komplementäre Überhänge haben. Anschließend werden die Fragmente im gleichen Mischungsverhältnis und einem Überschuss an dNTPs in einer PCR Reaktion zusammengemischt.

Die CPEC-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 7 Pipettierschema des CPEC-Ansatzes.

Komponenten	Volumina
DNA Fragmente	Variabel (je 100 ng)
10 mM dNTPs	1,6 μ l
5x Q5 Puffer	5 μ l
Q5 DNA Polymerase	1 μ l
Bidest. Wasser	var.
	Add. 50 μ l

Anschließend wurde der Ansatz in einem Thermocycler mit folgendem Temperatur-Programm behandelt:

Tabelle 8 Temperaturprofil der CPEC Reaktion.

Name	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	
Annealing	55 °C	30 s	} 10 Zyklen
Extension	72 °C	15 s/kb	
Finale Extension	72 °C	5 min	

Nach der finalen Extension wurden 5 μ l des Ansatzes genutzt, um *E. coli* zu transformieren.

6.3.7. Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Plasmid-DNA und DNA-Fragmente wurden mittels Endonukleasen (NEB; Ipswich) nach Angaben des Herstellers sequenzspezifisch gespalten. Wenn nötig wurde gespaltene Plasmid-DNA im Anschluss mit der antarktischen Phosphatase (NEB; Ipswich) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert.

6.3.8. Ligation

Neben der CPEC-Methode wurde für die Verknüpfung von DNA Fragmenten auch die klassische Ligation genutzt. Es wurde stets ein Ligationsverhältnis von 3 Teilen Insert zu 1 Teil Vektor genutzt. Für die Ligation wurde die T4 DNA Ligase von NEB genutzt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.3.9. Transformation von *Wolinella succinogenes*

Für die Transformation wurden 10 ml Formiat/Fumarat-Medium mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur von *W. succinogenes* inokuliert und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die 10 ml Kultur wurde nach der Inkubation in ein 15 ml Zentrifugierröhrchen überführt und bei 5.000 g für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in steriler, anaerober und eiskalter 0,3 M Saccharoselösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde im Rücklauf resuspendiert. 1,5 µg Plasmid DNA wurden mit der Zellsuspension vermengt und in eine Elektroporationsküvette überführt.

Die Elektroporation wurde bei 1,25 kV, 800 Ω und 25 µF mit dem GenePulser (Biorad, Hercules) durchgeführt. Anschließend wurde sofort 1 ml eiskaltes Formiat/Fumarat-Medium hinzugegeben, die Zellsuspension in ein steriles und anaerobes Hungate-Röhrchen überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation, wurden 900 µl bzw. 100 µl der Zellsuspension in je eine leere Petrischale gegeben und mit 20 ml 40 °C warmem Antibiotikahaltigem Formiat/Fumarat-Agar eingegossen. Die Petrischalen wurden 3 Tage anaerob bei 37 °C inkubiert.

6.3.10. Charakterisierung von *Wolinella succinogenes* Transformanden

Nach der Inkubation wurden die Kolonien mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Agar gestochen und 24 h in 1 ml Formiat/Fumarat-Medium anaerob inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden zum einen mittels PCR auf die homologe Rekombination überprüft und zum anderen wurde durch eine zweite PCR-Reaktion überprüft, ob die Rekombination doppelt homolog erfolgt ist.

6.3.11. Transformation von *Escherichia coli*

Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen:

Vor der Transformation mussten chemisch kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt werden. Dafür wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 50 ml eiskalter 25 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 2,5 ml 20 %iger Glycerin - Lösung resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Transformation von *E. coli* mittels der Hitzeschock Methode:

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4 °C erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für ca. 60 Sekunden. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und mit 500 µl LB-Medium versetzt. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C und 300 rpm im Thermoschüttler inkubiert und anschließend auf Selektionsagar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 Stunden.

6.4. Biochemische Methoden

6.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde für die aufgereinigten Proteine verwendet. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das gebrauchsfertige Roti®-Nanoquant-Assay-Reagenz von Carl Roth (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.4.2. Eisenquantifizierung

Der Eisengehalt von MenK wurde mittels der TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-triazin)-Methode bestimmt (Fischer & Price, 1964). TPTZ bildet mit Eisen(II)-Ionen einen stabilen blauen Komplex, der photometrisch bei 593 nm quantifiziert werden kann. Zu 800 µl Probe wurden 100 µl 8 M HCl hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 80 %ige (w/v) TCA-Lösung hinzugegeben und erneut 10 min bei RT inkubiert. Das denaturierte Protein wurde mittels Zentrifugation (13.000 g; 10 min) präzipitiert, und 800 µl des Überstandes wurden zusammen mit 250 µl 75 %iger (w/v) Ammoniumacetat-Lösung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Fe³⁺ Ionen wurden mit 100 µl 10 %iger (w/v)

Hydroxylamin-Lösung zu Fe^{2+} reduziert. Nach der Reduktion wurden $100\ \mu\text{l}$ 4 mM TPTZ-Lösung hinzugegeben, gut gemischt und sofort die Absorption bei 593 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ erstellt, die im Folgenden exemplarisch gezeigt ist (Abb. 12).

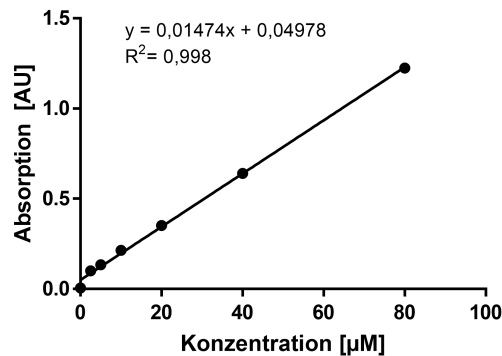


Abbildung 12 Kalibriergerade zur Bestimmung Eisen(II)-Ionen-Konzentration.

6.4.3. Sulfid-Bestimmung

Die Bestimmung von Sulfid wurde nach King & Morris (1967) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Bildung von Methylenblau durch gelöste Sulfid-Ionen, welches bei 670 nm quantifizierbar ist.

$50\ \mu\text{l}$ der Probe wurden zunächst mit $300\ \mu\text{l}$ bidest. Wasser verdünnt und mit $250\ \mu\text{l}$ 2,6 %iger (w/v) Zinkacetatlösung (gelöst in 0,1 %iger (v/v) Essigsäure) vermengt. Zu dieser Lösung wurden $125\ \mu\text{l}$ 0,1 % (w/v) N,N-Dimethyl-*p*-phenyldiamin (gelöst in 5 M HCl) und $50\ \mu\text{l}$ 11,5 mM FeCl_3 (gelöst in 0,6 M HCl) hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand bei 670 nm photometrisch gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Ammoniumsulfid erstellt, die im Folgenden exemplarisch gezeigt ist (Abb. 13).

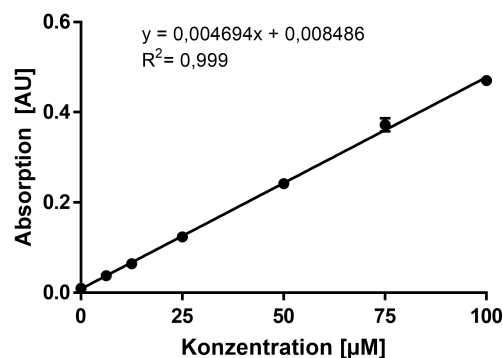


Abbildung 13 Kalibriergerade zur Bestimmung Sulfid-Konzentration.

6.4.4. Sulfit-Bestimmung

Die Bestimmung von Sulfit wurde nach dem Protokoll von Pachmayer durchgeführt (Pachmayer, 1960). Hierfür wurden 100 μl Fuchsin-Reagenz (40 mg Fuchsin in 12 %iger Schwefelsäure) mit 800 μL der Probe gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden 10 μl 37 %tige (w/v) Formaldehyd-Lösung hinzugegeben. Nach weiteren 90 min bei Raumtemperatur wurde die OD bei 570 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Natriumsulfit erstellt (Abb. 14).

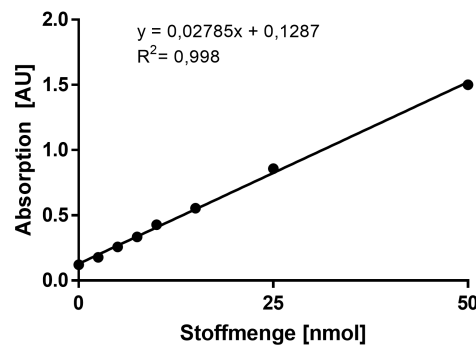


Abbildung 14 Kalibriergerade zur Bestimmung der Sulfit-Menge.

6.4.5. Formiat-Bestimmung

Formiat wurde mittels eines NAD^+ -gekoppelten Formiat-Dehydrogenase-Assays bestimmt (Bergmeyer, 1974). Die Reduktion von NAD^+ lässt sich photometrisch bei 366 nm verfolgen. Für den Test wurden 20 μl Probe (0-5 mM), 500 μl Puffer (150 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,5) und 60 μl NAD^+ (20 mM in Wasser) gemischt und die Absorption bei 366 nm gemessen. Anschließend folgte die Zugabe von 5 μl Formiatdehydrogenase (100 U/ml, Roche, Basel) und eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde erneut die Absorption bei 366 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte durch die Subtraktion der beiden gemessenen Werte. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Fumarat zwischen 0 mM und 5 mM erstellt (Abb. 15).

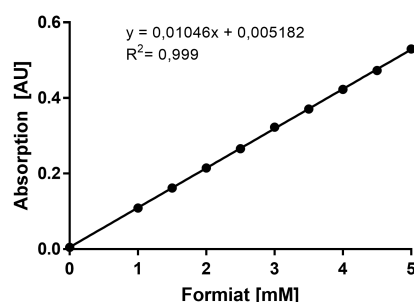


Abbildung 15 Kalibriergerade zur Bestimmung der Formiat-Konzentration.

6.4.6. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-SDS-Page

Gesamtzellprotein, gereinigte Proteine oder proteinhaltige Fraktionen wurden mithilfe der SDS-Page nach Lämmli (1970) untersucht. Mittels der SDS-Page ist es möglich Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse zu trennen. Um dies zu ermöglichen wird der Probe SDS zugesetzt. SDS ist ein anionisches Detergenz und lagert sich an das Proteinrückgrat an, wodurch die Eigenladung des Proteins maskiert wird. Daher wandern mit SDS behandelte Proteine im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht zur Anode. Die SDS-Gele wurden nach der unten aufgeführten Zusammensetzung angesetzt. Die Proben wurden für die SDS Page mit 4-fach denaturierendem Probenpuffer (RotiLoad1, Carl Roth, Karlsruhe) behandelt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 50 mA pro SDS-Gel in der Mini PROTEAN® Tetra Cell (Biorad, Hercules) durchgeführt. Zur Identifikation der Proteingrößen wurde der Color Prestained Protein Standard (NEB; Ipswich) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Trenngelpuffer

Tris/HCl 1,5 M; pH 8,8

Sammelgelpuffer

Tris/HCl 0,5 M; pH 6,8

Färbelösung

Tris/HCl	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
<hr/>	
ad 2.000 ml dest. Wasser	

Trenngel

Komponenten	12,5 %	15 %
Acrylamid-Lsg. (37,5:1)	6,25 ml	7,5 ml
Bidest. Wasser	4,75 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl	150 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl
TEMED	25 µl	25 µl

Sammelgel

Komponenten	
Acrylamid-Lsg. (37,5:1)	1,00 ml
Bidest. Wasser	3,40 ml
Sammelgelpuffer	1,50 ml
10 % (w/v) SDS	60 µl
10 % (w/v) APS	20 µl
TEMED	12 µl

6.4.7. Coomassie-Färbung

Die Detektion von Proteinen im SDS-PA-Gel erfolge mittels der Coomassie-Färbung. Das SDS-Gel wurde zunächst mit 100 ml dest. Wasser für 20 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel mit 50 ml Färbelösung 5 Sekunden aufgekocht und bei Raumtemperatur für 3-5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit 10 %igem (v/v) Ethanol für mindestens 18 Stunden.

Färbelösung

Coomassie® Brilliant Blue G250	80 mg/l
Salzsäure	35 mM

6.4.8. Häm-Färbung

Zur selektiven Färbung von c-Typ Cytochromen wurde die Häm-Färbung angewandt (Francis & Becker, 1984). Hierfür wurde das SDS-PA-Gel mit 12,5 % (w/v) TCA für 30 min fixiert. Anschließend wurde das Gel 3-mal für 10 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 100 ml frisch angesetzter Färbelösung für mindestens 60 min schwenkend inkubiert.

Färbelösung

o-Dianisidin Dihydrochlorid	100 mg
0,5 M Natriumcitrat (pH 4,4)	10 ml
H ₂ O ₂ 30 % (w/w)	200 µl
<hr/> ad 100 ml dest. Wasser	

6.4.9. Western Blot und ELISA

Für den Nachweis eines spezifischen Proteins wurden nach der SDS-Page die Proteine auf eine PVDC-Membran transferiert. Die Membran wurde dafür zunächst mit Methanol für 1 Minute hydrophobisiert bevor sie mit Anodenpuffer II für 5 min inkubiert wurde. Auf die Anodenplatte wurden 4 in Anodenpuffer I getränkte Whatman-Papiere gelegt. Anschließend wurden zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere, die PVDC-Membran, sowie das SDS-Gel darauf gestapelt. Abschließend kamen 6 Whatman-Papiere, die in Kathodenpuffer getränkt wurden, auf das SDS-Gel. Es wurde darauf geachtet, dass alles blasenfrei geschichtet wurde. Der Proteintransfer wurde bei 0,04 mA pro cm² für 90 Minuten durchgeführt.

Anodenpuffer I

Tris/HCl 0,3 M; pH 10,4
Methanol 20 % (v/v)

Anodenpuffer II

Tris/HCl 25 mM; pH 10,4
Methanol 20 % (v/v)

Kathodenpuffer

Tris/HCl 25 mM; pH 9,4
Methanol 20 % (v/v)
Aminohexansäure 40 mM

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran, wurde die Membran für 4 Stunden in 1-fach PBS-Puffer mit 3 % (w/v) BSA (biotinfrei, Albumin Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe) schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. 10 Minuten vor Ablauf der 4 Stunden wurden 10 µl Biotin-Blocking-Puffer (IBA Lifesciences, Göttingen) hinzugegeben. Anschließend wurde die Membran mit 15 ml PBS für 5 min gewaschen bevor die Membran mit dem Antikörper (StrepMAB-Classic HRP (IBA Lifesciences, Göttingen) oder Anti-MBP-HRP (NEB; Ipswich)) für eine Stunde inkubiert wurde. Die Membran wurde anschließend 2-mal mit 10 ml PBS mit 0,1 % (v/v) Tween20 und 1-mal mit PBS gewaschen. Jeder Waschschrift wurde 15 min leicht schüttelnd durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit der Entwicklerlösung solange inkubiert bis die chromogene Reaktion die gewünschte Intensität erreicht hat. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Membran mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend umgehend dokumentiert.

10-fach PBS-Puffer

NaCl 72,0 g
Na₂HPO₄ x 2 H₂O 14,2 g
NaH₂PO₄ x H₂O 2,8 g

Entwicklerlösung

4-Chloro-1-Napthol 30 mg
Ethanol 5 ml
H₂O₂ 30 % (w/w) 20 µl
1-fach PBS 15 ml

6.4.10. Heterologe Produktion Menachinon-Methyltransferasen in *E. coli*

Für die weitere Untersuchung der Methylmenachinon-Biosynthese wurden diverse putative Menachinon-Methyltransferasen in *E. coli* produziert. Dafür wurden 500 ml TB-Medium mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes beimpft und für 4 h bei 37 °C und 130 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 4 wurde die Expression der Menachinon-Methyltransferasegene mit dem jeweiligen Induktor (IPTG, finale Konzentration: 0,5 mM; AHT, finale Konzentration: 100 µg/L) induziert. Anschließend wurde der Kultur Eisen(III)citrat (finale Konzentration: 0,25 mM) und L-Cystein (finale Konzentration: 0,5 mM) zugegeben und für weitere 12 h bei 37 °C und 130 rpm kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen für 10 min bei 10.000 g und 4 °C sedimentiert und die Chinone wurden wie in 6.5.1 beschrieben analysiert.

6.4.11. Produktion und Reinigung von Menachinon-Methyltransferasen in *E. coli*

Maltose-Binde-Protein (MBP)-Affinitätschromatographie

Die MBP-Affinitätschromatographie beruht auf der starken Bindung von Maltose an das Maltose-Binde-Protein (MBP). Für die Reinigung wird das Gen des Zielproteins mit dem Maltose-Binde-Protein Gen fusioniert und in einen geeigneten Vektor eingebracht, wodurch das Fusionsprotein MBP-Zielprotein produziert werden kann. Dieses kann durch die Bindung des MBP an einer mit Dextrin vernetzten Sepharose als Säulenmatrix gereinigt werden. Eluiert wird das Protein anschließend mit Maltose.

Erstellung des pMBP-Ae-menK Vektors

Zur Erstellung des Expressionsvektors wurde der Vektor pMal-c2X mit den in der Tabelle 17 aufgeführten Primern pMAL-F und pMAL-R mittels PCR linearisiert. Das Genfragment *AemenK* wurde mit den Primern AeMenK-Mal-F und AeMenK-Mal-R amplifiziert und phosphoryliert. Anschließend wurden beide Fragmente *blunt-end* ligiert und Zellen von *E. coli* XL-1 Blue mit dem Ligationsprodukt transformiert. Die Orientierung des Genfragments wurde nach der Plasmidisolation mittels DNA-Restriktion analysiert. Die positiven Konstrukte wurden zur Bestätigung der Nukleotidsequenz sequenziert.

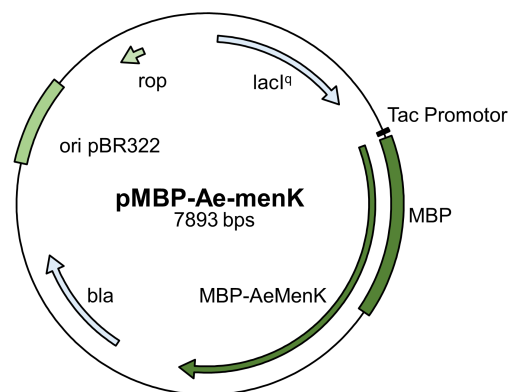


Abbildung 16 Plasmidkarte des Plasmids pMBP-Ae-menK. Das Fusionsgen *MBP-AemenK* ist als dunkelgrüner hervorgehobener Pfeil dargestellt. Die dunkelgrüne Box zeigt das *MBP* Gen an.

Produktion und Reinigung von MBP-AeMenK

500 ml TB-Medium wurden mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* XL-1 Blue pMBP-Ae-menK beimpft und bei 37 °C und 130 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 4,5 wurde die Expression von *AemenK* mit IPTG (finale Konzentration: 0,25 mM) induziert. Zudem wurde der Kultur Eisen(III)citrat (finale Konzentration: 0,25 mM) und L-Cystein (finale Konzentration: 0,5 mM) zugegeben und für weitere 3 h bei 37 °C und 130 rpm kultiviert.

Anschließend wurde die Kultur in eine Serumflasche überführt und unter anoxischen Bedingungen für 2 h bei 30 °C langsam (60 rpm) geschwenkt. Zur Reifung des Eisen-Schwefel-Clusters wurde die Kultur anaerob für 20 h bei 4 °C gelagert. Nach der Produktion wurden die Zellen für 10 min bei 10.000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in 30 ml anaerobem Puffer W resuspendiert. Die Zellen wurden mit der FrenchPress aufgebrochen (10 MPa und 10 ml/min) und die Zelltrümmer mittels Ultrazentrifugation (100.000 g; 45 min; 4 °C) sedimentiert. Die Reinigung erfolgte im Anaerobier-Zelt bei 0 ppm O₂. Für die Reinigung des MBP-AeMenK Proteins wurde die 5 ml MBPTrap™ HP Säule der Firma GE Healthcare Life Sciences (Freiburg) genutzt. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer W equilibriert und anschließend mit der löslichen Fraktion beladen. Vor der Elution mit 20 ml Puffer E wurde die Säule erneut mit 25 ml Puffer W gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 15 ml 0,5 M NaOH und 15 ml 20 %igem Ethanol regeneriert und bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C gelagert. Das Eluat wurde auf 5 mg/ml Protein aufkonzentriert (Vivaspin MW 30 kDA, Satorius, Göttingen) und bei -80 °C gelagert.

Puffer W

Tris/HCl	20 mM; pH 7,4
NaCl	200 mM
DTT	1 mM

Puffer E

Tris/HCl	20 mM; pH 7,4
NaCl	200 mM
Maltose	10 mM
DTT	1 mM

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie - IMAC

Die Aminosäure Histidin ist in der Lage zweiwertige Metalle wie Nickel oder Kobalt zu chelatieren. Diese Eigenschaft macht sich die IMAC Technologie zunutze. An das Zielgen werden 6-12 Histidin-kodierende DNA-Triplets angebracht, sodass das produzierte Protein C- und/oder N-Terminal eine Verlängerung um diese Histidinreste besitzt. Das Protein ist so in der Lage zweiwertige Metalle zu chelatieren und bindet damit auf einer mit Nickel equilibrierten Säulenmatrix aus Nitrilotriessigsäure.

Erstellung des pET28a-AemenK Vektors

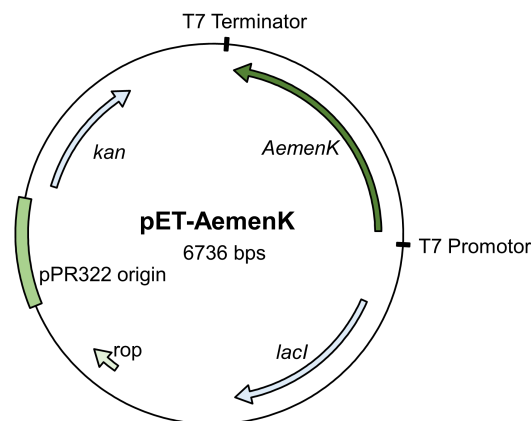


Abbildung 17 Plasmidkarte des Plasmids pET-AemenK. Das *AemenK* Gen mit der His-Tag-Sequenz ist als dunkelgrüner hervorgehobener Pfeil dargestellt.

Aufgrund der intrinsischen XhoI Restriktionsschnittstelle von *AemenK* wurde der pET28a-AemenK mittels CEPC erstellt. Das pET28a Vektor Fragment wurde mit den Primern pET28a-CPEC-F und pET28a-CPEC-R amplifiziert (Tab. 17). Für das Genfragment wurden die Primer Aeq0025-pET28a-R und Aeq0025-pET28a-F verwendet und als Templat wurde der pMBP-Ae-menK Vektor genutzt. Anschließend wurden beide gereinigten Fragmente mittels CPEC verbunden und Zellen von *E. coli* XL-1 Blue mit dem CEPC-Produkt transformiert. Die Kolonien wurden auf das Vorhandensein von *AemenK* mit den Primern Aeq0025-pET28a-R und Aeq0025-pET28a-F kontrolliert. Aus den gewollten Kolonien wurde das Plasmid isoliert und sequenziert. *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem erstellten Vektor transformiert.

Produktion und Reinigung von AeMenK-His

Für die Produktion von AeMenK-His wurden 500 ml TB-Medium mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* BL21 (DE3) pet28(a)-AeMenK beimpft und für ca. 5 Stunden bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 3 inkubiert. Die Expression des *AemenK*-His Gens wurde mit 0,25 mM IPTG induziert. Zusätzlich wurde dem Medium zum Zeitpunkt der Induktion 0,25 mM Eisen(III)citrat und 0,5 mM L-Cystein zugegeben. Die Kultur wurde für weitere 20 h bei 30 °C und 130 rpm kultiviert. Nach der Produktion des MenK Proteins wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 10.000 g für 10 min und bei 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde entweder bei – 20 °C gelagert oder direkt in 50 ml Puffer L gelöst. Die Zellen wurden wie beschrieben mittels FrenchPress aufgeschlossen und die Zelltrümmer anschließend in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g für 45 min sedimentiert. Der Überstand wurde mithilfe einer Peristaltikpumpe und einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf eine mit Puffer E

equilibrierte HisTrap FF Crude Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 5 CV Puffer W gewaschen bevor das Protein mit 5 CV Puffer eluiert wurde. Die Elutionsfraktionen wurden auf 3 ml ankonzentriert (Vivaspin MW 30 kDA, Satorius). Im Anschluss wurde das Eisen-Schwefel-Cluster rekonstituiert.

Puffer L

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	15 mM
DNAse	100 mg/l
Lysozym	200 mg/l

Puffer E

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	15 mM

Puffer EL

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	250 mM

Puffer W

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	40 mM

6.4.12. Heterologe Produktion von Fpr und FldA in *E. coli*

Neben der chemischen Reduktion von Eisen-Schwefel-Clustern, kann das NADPH-abhängige Fpr/FldA Reduktionssystem genutzt werden. Da dieses System kommerziell nicht erhältlich ist, musste es selbst hergestellt werden. Hierfür wurden die Proteine Fpr und FldA aus *E. coli* MG1655 in *E. coli* BL21(DE3) produziert und gereinigt.

Erstellung von pET-Fpr und pET-FldA

Die Erstellung beider Vektoren erfolgte nach der Vorschrift von Ding et. al (2017a). Die Gene *fpr* und *fldA* wurden aus *E. coli* MG1655 mithilfe der Primerpaare FldA-F/FldA-R und Fpr-F/Fpr-R amplifiziert. Die Gene wurden nach der Amplifizierung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (für *fpr* mit EcoRI/HindIII und für *fldA* mit EcoRI/SalI) behandelt. Der Vektor pET-28a(+) wurde für das jeweilige Gen mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Vektor und Insert wurden wie in Kapitel 6.3.8 beschrieben ligiert. *E. coli* XL-1 Blue wurde mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert. Aus den gewollten Transformanten wurde das Plasmid isoliert und der relevante Bereich wurde sequenziert. Die erhaltenen Plasmide sind im Folgenden dargestellt (Abb. 18).

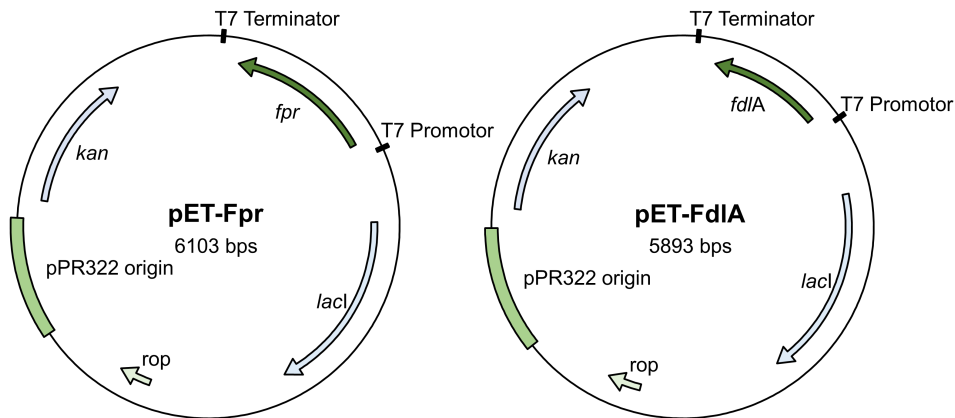


Abbildung 18 Plasmidkarten der Plasmide pET-Fpr und pET-FldA. Das *fpr* bzw. das *fldA* Gen mit der His-Tag Sequenz sind als dunkelgrüner hervorgehobener Pfeil dargestellt.

Expression von *fpr* und *fldA*

Die erstellten Plasmide wurden je in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Jeweils eine Kolonie wurde in 50 ml LB-kan über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von beiden Übernachtskulturen wurden jeweils 5 ml genutzt, um 0,5 l TB-Medium zu inokulieren. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 200 rpm solange kultiviert bis diese eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 erreicht hatte. Anschließend wurden 200 µl 1 M IPTG Lösung (finale Konzentration: 0,4 mM) hinzugegeben und die Kulturen bei 25 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

Reinigung von Fpr und FldA mittels IMAC

Nach der Kultivierung wurden die Zellen mittels Zentrifugation (10 min; 10.000 g und 4 °C) geerntet. Das Sediment wurde in 30 ml Puffer L resuspendiert und durch die FrenchPress aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden in der Ultrazentrifuge (60 min; 100.000 g und 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde jeweils in ein 50 ml-Falcon-Gefäß überführt und mit Puffer E auf 50 ml aufgefüllt. Jeweils 50 µM des jeweiligen Kofaktors (FMN für FldA bzw. FAD für Fpr) wurden hinzugegeben, und zum Einlagern der Kofaktoren in die produzierten Proteine wurde der Überstand 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde pro Reinigung eine 5 mL Ni-NTA Säule (HisTrap HP, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) mit 25 ml Puffer E equilibriert. Anschließend wurde der Überstand auf die Säule gegeben und die Säule mit 50 ml Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 ml Puffer EL. Sämtliche Lösungen wurden mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe auf die Säule gepumpt, die Geschwindigkeit betrug hierbei 3 ml pro Minute. Die farbigen Fraktionen wurden vereinigt und mit einem Amicon Ultra-15 Zentrifugalfilter auf ca. 5 mg/ml konzentriert. Die Proteine wurden durch 15-minütiges Begasen mit Stickstoffgas anaerobisiert und zu 500 µl Portionen bei -80 °C eingelagert.

Puffer L

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	15 mM
DNase	100 mg/l
Lysozym	200 mg/l

Puffer E

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	15 mM

Puffer EL

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	250 mM

Puffer W

Tris/HCl	40 mM; pH 8,0
NaCl	200 mM
Imidazol	40 mM

6.4.13. Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Zentrums in Menachinon-Methyltransferasen

Bei der aeroben Reinigung wird das [4Fe-4S]-Zentrum, welches in der radikalischen SAM Enzym Familie eine wichtige katalytische Rolle einnimmt, durch Sauerstoff zerstört. Daher muss das Zentrum chemisch wieder zurückgebildet werden. Diese Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Zentrums von AeMenK fand im Anaerobier-Zelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake; Sauerstofflevel unter 2 ppm O₂) statt. Zuerst wurde zu dem gereinigten Protein (max. Volumen 3 ml) eine 1 M Dithiothreitol-Lösung bis zu einer Konzentration von 5 mM hinzugegeben. Anschließend wurde der reduzierten Proteinlösung langsam eine 80 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂-Lösung hinzugegeben bis die Konzentration von Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ in der Proteinlösung bei 800 µM lag. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde langsam eine 80 mM Na₂S-Lösung hinzugegeben bis ebenfalls eine Konzentration von 800 µM erreicht wurde. Zur Formierung des Eisen-Schwefel-Zentrums wurde die Lösung für 16 h auf Eis inkubiert. Die entstandene dunkelbraune Lösung wurde über eine mit Tris-Glycerin-Puffer (40 mM Tris, 25 mM NaCl, 10 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin, pH 8,0) equilibrierte PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) von ungebundenem Eisen gereinigt. Anschließend wurde das Protein direkt für den Enzymtest genutzt oder bei -80 °C gelagert.

6.4.14. Aktivitätsassay von MenK

Qualitativer Aktivitätsassay (liposomen-abhängig)

Vor der quantitativen Aktivitätsbestimmung wurde der Aktivitätstest mit langkettigen Menachinonen durchgeführt. Dazu wurden chinonhaltige Liposomen wie folgt hergestellt. 1 mg L- α -Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 20 μ g L- α -Phosphatidylethanolamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 100 μ g HPLC-gereinigtes MK₆ (aus *W. succinogenes* DSM 1740) wurden in 1 ml Chloroform gelöst. Diese Lösung wurde mit der SpeedVac bis zur Trockne eingengt. Um die Liposomen zu erhalten, wurde der Rückstand in 4 ml Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄; pH 7,4) aufgenommen und 2 min sonifiziert (Branson Sonifier model 250; Puls Intervall 90 %; Stufenstärke 5). Für den Enzymtest wurden 400 μ l der Liposomenlösung mit 10 μ M gereinigtem MBP-AeMenK, 0,32 μ M SAM und 20 mM Dithionit in einem Volumen von 500 μ l im Anaerobier-Zelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake; Sauerstofflevel unter 2 ppm O₂) bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wurden zum Stoppen der Reaktion 500 μ l Benzin hinzugegeben. Die organische Phase wurde in der SpeedVac eingengt und der Rückstand wurde in 150 μ l Methanol gelöst. Der Chinonextrakt wurde mit derselben Methode analysiert wie für die Chinone aus *W. succinogenes* (Kap. 6.5.2).

Quantitativer Aktivitätsassay (liposomen-unabhängig)

Zur quantitativen Aktivitätsbestimmung wurde eine HPLC-MS basierte Analyseverfahren gewählt. Da es bei einem MS-vermittelten System wichtig ist, möglichst detergenezfreie Proben einzusetzen, wurde der Assay so modifiziert, dass keine Liposomen notwendig waren. Um zu gewährleisten, dass alle Lösungen anaerob sind, wurden alle Lösungen vor Gebrauch mindestens 20 min mit Stickstoff durchgast. Als Chinon wurde Menachinon-4 eingesetzt, das zuvor als 100fach-Konzentrat in einem Lösemittelgemisch von 60 : 40 DMSO : Isopropanol gelöst wurde. Der Enzymtest wurde mit 50 μ M AeMenK-His, 1 mM SAM, 1 mM NADPH, 50 μ M FldA, 30 μ M Fpr (oder 1 mM Dithionit anstelle von NADPH, FldA, Fpr) und 120 μ M MK₄ in Tris Puffer (40 mM; pH 8,0) in einem Volumen von 200 μ l durchgeführt. Die Reaktion verlief bei 30 °C für maximal 24 h. Nach der Reaktion wurde der Enzymtest mit 200 μ l eiskaltem Acetonitril abgestoppt und für 30 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und 5 μ l wurden mit dem 1260 Infinity HPLC System (G4225A Entgaser, G1312B Pumpe, G1329B Autosampler, G1316C Säulenofen, G4212B DAD-Detector; Agilent, Santa Clara, CA, USA) gekoppelt an das 6120 Quadrupole Massenspektrometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) analysiert. Die Flussrate belief sich auf 0,5 ml/min, der Ofen war auf 30 °C vortemperiert und die mobile Phase setzte sich aus A: Acetonitril mit 0,01 % Ameisensäure und B: Bidest. Wasser mit 0,01 % Ameisensäure zusammen. Für die Trennung wurde die Eclipse

XD8-C8 5 mm 4.5x150mm Säule (Agilent, Santa Clara, CA, USA) und folgender Gradient verwendet (B %): 0 – 2 min, 95 %; 2-22 min, Gradient von 95 % – 0 %; 22–26 min, 0 %; 26,01–33 min, 95 %. Die Analyten wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) und einer Spannung von 3 kV ionisiert und im positiven Modus detektiert (Scan Modus: 150 – 800 m/z). Elementarer Stickstoff wurde zum Vernebeln und zum Trocken genutzt (35 psi; 350 °C, 12 l/min). Quantifiziert wurde die Fläche unter den Signalen der extrahierten Ionen-Chromatogramme der Stoffe SAH, MTA, 5-Ado und die Fläche der Signale von MK₄ und 8-MMK₄ bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Kalibriergeraden wurden mit denselben Parametern aufgenommen und sind in Abbildung 19 dargestellt. Im Falle von 8-MMK₄ wurde die Kalibriergerade von MK₄ zum Quantifizieren herangezogen, da der Extinktionskoeffizient bei 260 nm für beide Stoffe identisch ist und 8-MMK₄ nicht kommerziell erhältlich ist.

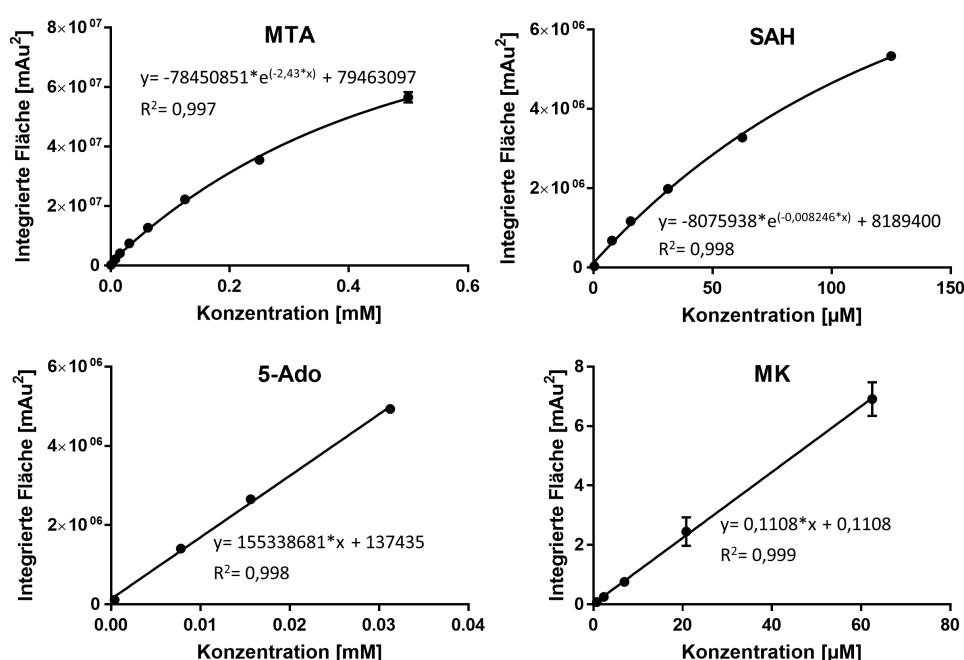


Abbildung 19 Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von MTA, SAH, 5-Ado und MK₄.

Mittels ES-Ionisierung sind die hydrophoben Verbindungen MK₄ und 8-MMK₄ nicht nachweisbar. Daher wurden zur Identifizierung beider Substanzen 5 µl des Enzymtests nach 24 h mittels HPLC-MS und einer APCI Ionisierungsquelle analysiert. Genutzt wurde dafür das Agilent-HPLC System 1200 welches an das Impact II Massenspektrometer (Bruker Daltonik) gekoppelt wurde. Als Ionisierungsquelle wurde APCI (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck) mit einer Koronaentladung von 5 kV benutzt.

6.4.15. Enzymtests mit Deuterium-markierten Substraten

Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus von AeMenK wurden einige Tests in deuteriertem Puffer durchgeführt. Dafür wurden je 20 ml der zuvor hergestellten Tris-Glycerin-Puffer (40 mM Tris, 25mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerin, pH 8,0) und Tris-Puffer (40 mM; pH 8,0) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Die Rückstände wurden in je 5 ml 99 %igem deuteriertem Wasser (Sigma Aldrich, Taufkirchen) gelöst. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt. Abschließend wurden die Rückstände in 20 ml 99,9 %igem deuteriertem Wasser (Sigma Aldrich, Taufkirchen) gelöst. Von den Puffern wurde in beiden Fällen ein pD-Wert von 8,0 ermittelt. Die Proteine AeMenK-His, Fpr und FldA wurden anschließend mit einer PD-10 Säule (equilibriert mit Tris-Glycerin Puffer (40 mM Tris, 25 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerin, pD 8,0)) umgepuffert, sodass die Proteine für den Assay in deuteriertem Puffer vorlagen. Alle weiteren Komponenten wurden statt in Wasser in 99,9 %igem schweren Wasser gelöst. Anschließend wurde der Assay in verschiedenen Kombinationen von deuterierten und nicht-deuterierten Komponenten durchgeführt (Kap. 6.4.14). Im Falle vom deuteriertem SAM wurde dem Assay nicht 1 mM zugesetzt, sondern eine Konzentration von 0,1 mM, da die Konzentration der von Prof. Qi Zhang zur Verfügung gestellten Lösung nur 2 mg/ml betrug. Das deuterierte MK₄ wurde von Sigma Aldrich bezogen. Die Inkubationszeit betrug 1 h bzw. 24 h bei 37 °C.

6.4.16. Erstellung der Vektoren

Erstellung der pACYC-Duet1-basierten *menK/mqnK/menK2* Expressionsvektoren

Für die *in vitro* Charakterisierung der MenK/MqnK und MenK2-Proteine wurde zur Expression der entsprechenden Gene der pACYC-Duet1 Vektor genutzt. Dieser Vektor besitzt zwei *Multiple-Cloning-Sites* und ermöglicht die gleichzeitige Expression zweier Gene. Die Expression steht hier unter der Kontrolle eines T7 Promotors. Daher ist es notwendig einen *E. coli* Stamm (z.B. *E. coli* BL21(DE3)) zu nutzen, der die T7-RNA Polymerase produziert. Die Expression der T7-RNAP wird durch die Zugabe von IPTG induziert und damit indirekt auch die Expression des Zielgens. Die Gene *WsmqnK*, *AemenK* und *AemenK2* wurden mit den in Tabelle 17 angegebenen Primern amplifiziert und anschließend mit dem zuvor linearisierten pACYC-Duet1 Fragments mithilfe der CPEC-Methode ligiert. Die Gene wurden durch diese Methode in die zweite MCS kloniert, sodass die in Abb. 20 gezeigten Plasmide resultierten. Die Produktion der Proteine ist in Kapitel 6.4.10 beschrieben.

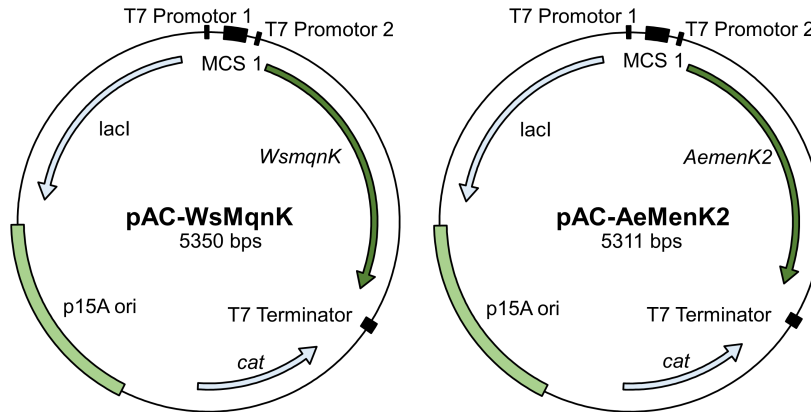


Abbildung 20 Plasmidkarten der Plasmide pAC-WsMqnK und pAC-AeMenK2. Die zu produzierenden Gene sind als dunkelgrün hervorgehobener Pfeil dargestellt.

Erstellung der pRecovrD basierten *menK/mqnK/menK2* Expressionsvektoren

Der Vektor pRCD-*mqnK* wurde von Dr. Melanie Kern erstellt, indem Sie den Vektor pRecovrD mit den Primern FrpRecovrD-F und FrpRecovrD-R linearisierte und anschließend das mit den Primern MqnK-Recfor-F und MqnK-Recfor-R aus dem Genom von *W. succinogenes* amplifizierte P_{mqnK}-*mqnK* Fragment über eine *blunt-end* Ligation in den linearisierten Vektor einfügte (Tab. 17). Durch Linearisierung des Vektors pRCD-*mqnK* mit den Primern MTaseY-F und MTaseY-R und durch Blunt-End Ligation des mit den Primern RCD-Aeq0025-F und RCD-Aeq0025-R amplifizierten *AemenK* Gens wurde der Vektor pRCD-*AemenK* erstellt. Der Vektor pRCD-*AemenK2* wurde analog erstellt. Die Amplifizierung des *AemenK2* Fragments erfolgte mit den Primern RCD-Aeq1016-F und RCD-Aeq1016-R. Die drei erstellten Vektoren sind in der folgenden Abbildung 21 dargestellt.

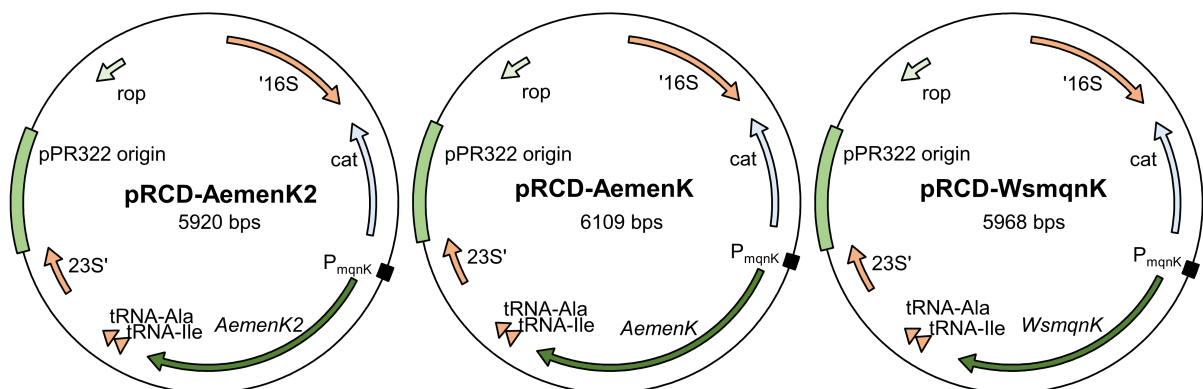


Abbildung 21 Plasmidkarten der Plasmide pRCD-*mqnK*, pRCD-*AemenK* und pRCD-*AemenK2*. Die zu produzierenden Gene sind als dunkelgrün hervorgehobener Pfeil dargestellt. Die orangefarbenen Pfeile stellen den vorderen bzw. hinteren flankierenden Bereich für die doppelt homologe Rekombination in *W. succinogenes* dar.

Erstellung der pMK2 basierten *menK*/*menK2* Expressionsvektoren

Für die Vektoren pMK2-AeMenK und pMK2-AeMenK2 wurde das Plasmid pMK2 mit den Primern Strep-MK2-Rev und Strep-MK2-For linearisiert (Tab. 17). Die Gene *AemenK* und *AemenK2* wurden mit den angegebenen Primern aus Tab. 17 amplifiziert. Anschließend wurden die Gene mittels CPEC in den linearisierten Vektor eingefügt. Die mittels Sequenzierung bestätigten Vektoren sind im Folgenden abgebildet (Abb. 22).

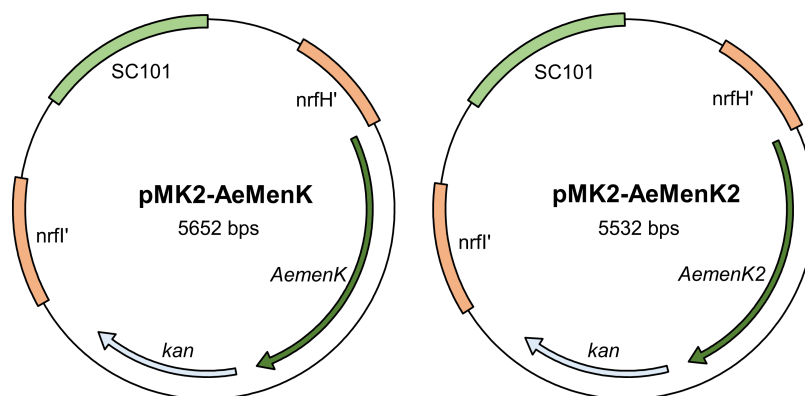


Abbildung 22 Plasmidkarten der Plasmide pMK2-AeMenK, pMK2-AeMenK2. Die zu produzierenden Gene sind als dunkelgrüner hervorgehobener Pfeil dargestellt. Die orangefarbenen Boxen stellen den vorderen bzw. hinteren flankierenden Bereich für die doppelt homologe Rekombination in *W. succinogenes* dar.

Erstellung der pPR-IBA3 basierten *menK*/*mqnK* Expressionsvektoren

Die Plasmide pWs-mqnK-Strep, pAe-menK-Strep und pSo-menK-Strep basieren auf dem pPR-IBA3 Vektor (IBA Lifesciences, Göttingen) und wurden für die Produktion der Methyltransferasen in *E. coli* XL1-Blue genutzt. Für die Erstellung der Vektoren wurden die Gene mit den angegebenen Primern aus Tab. 17 amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente, sowie der Vektor pPR-IBA3 wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym BsaI restringiert. Nach der Dephosphorylierung der Fragmente wurden die Gene jeweils mit dem linearisierten Vektor ligiert. Der pWs-mqnK-Strep wurde von Melanie Kern und die Vektoren pAe-menK-Strep und pSo-menK-Strep von David-Nikola Schul erstellt und sind im Folgenden dargestellt (Abb. 23).

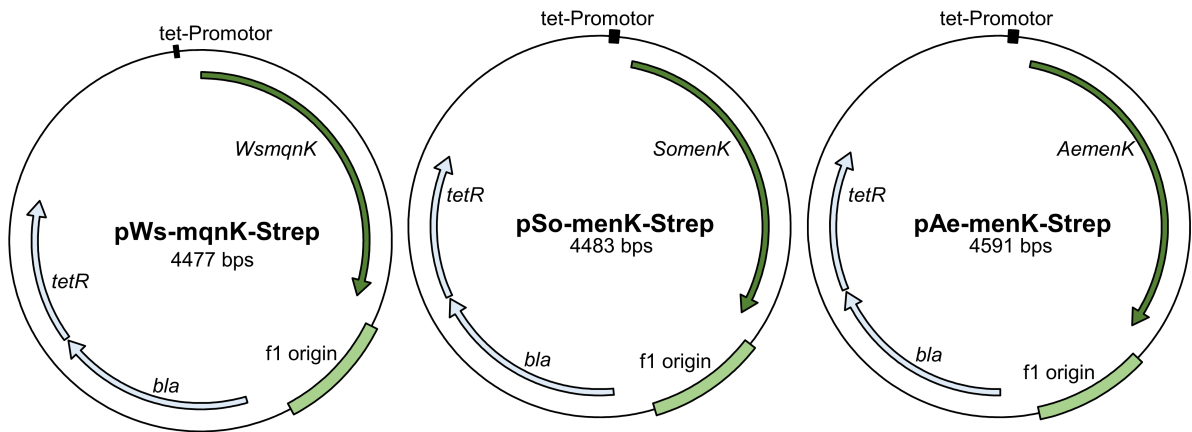


Abbildung 23 Plasmidkarten der Plasmide pWs-mqnK-Strep, pAe-menK-Strep und pSo-menK-Strep. Die zu produzierenden Gene sind als dunkelgrüner hervorgehobener Pfeil dargestellt.

Die Produktion der Proteine wurde wie in Kapitel 6.4.10 beschrieben durchgeführt. Mit dem Unterschied, dass statt IPTG 200 $\mu\text{g/l}$ AHT für die Induktion hinzugesetzt wurden.

Erstellung der Deletionsplasmide p ΔmqnK und p $\Delta\text{mqnK}::\text{apr}$

Das Plasmid p ΔmqnK wurde in Vorarbeiten durch Melanie Kern erstellt. Die Konstruktion erfolgte im ersten Schritt durch die Amplifikation des jeweils 500 bp großen vorderen und hinteren flankierenden Bereichs. Der vordere flankierende Bereich wurde mithilfe der Restiktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pPR-IBA3 eingeführt. Anschließend wurde der hintere flankierende Bereich mit den Restiktionsschnittstellen BamHI und EcoRI eingefügt. Die Kanamycin-Resistenzkassette (vom Vektor pUC4K) wurde anschließend mit BamHI in den Vektor pvfb/hfb-mqnK kloniert. Der resultierende Vektor wurde p ΔmqnK genannt und ist in Abbildung 24 zu sehen.

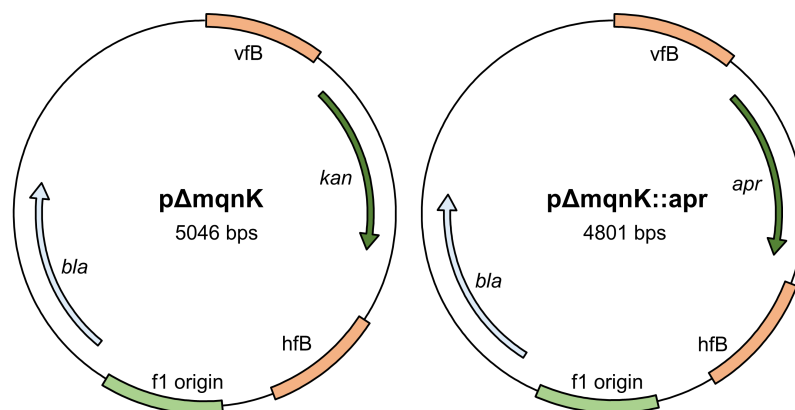


Abbildung 24 Plasmidkarten der Plasmide p ΔmqnK und p $\Delta\text{mqnK}::\text{apr}$. Die Resistenzkassette ist als dunkelgrüner hervorgehobener Pfeil dargestellt. Die orangenen Boxen stellen den vorderen bzw. hinteren flankierenden Bereich für die doppelthomologe Rekombination in *W. succinogenes* dar.

Zur Deletion von *mqnK* im Stamm *W. succinogenes* *napA::cat* AeMenK2 kan, musste die Resistenzkassette des Plasmids pΔmqnK getauscht werden. Dafür wurde das Plasmid pΔmqnK mit den Primern UNS3-deltaws0113 und UNS2-deltaws0113 linearisiert. Die Apramycin-Resistenzkassette wurde vom Plasmid pΔnrfHA mit den Primern UNS2-APR und UNS3-APR amplifiziert und anschließend mittels CPEC in den linearisierten pΔmqnK eingebracht. Der Vektor wurde pΔmqnK::apr genannt und ist in Abbildung 24 dargestellt.

6.5. Chemische Methoden

6.5.1. Chinon-Extraktion

Für die Chinon-Extraktion wurden die Zellen nach der Kultivierung bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert und anschließend in 5 ml Tris Puffer (40 mM; pH 8,0) resuspendiert. 40 ml Methanol und 5 ml Benzin (Siedepunkt 65 – 75 °C) wurden hinzugegeben und unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt bei 5.000 g für 5 min diente dazu die Benzin-Phase von der wässrigen Phase zu trennen. Die Benzin-Phase wurde abgenommen und bei 60 °C in der SpeedVac bis zur Trockne eingeeengt. Auf die wässrige Phase wurden erneut 5 ml Benzin gegeben und unter Schütteln für 20 min inkubiert. Die Phasen wurden erneut getrennt und die Benzin Phase wurde wie zuvor eingeeengt. Nach dem Verdampfen wurde der gelblich-ölige Chinon-Rohextrakt in 180 µl Methanol und 20 µl Benzin gelöst und mittels HPLC analysiert.

6.5.2. Chinon-Analyse mittels HPLC

Zur Analyse der Chinone wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) angewandt. Für die Trennung der Chinone wurde das Hitachi LaChrom Elite System genutzt. Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine allgemeine Methode für die Analyse der Chione genutzt, die später aufgrund von ungenügender Trennleistung für die jeweiligen Mikroorganismen optimiert wurde. Für die allgemeine Methode wurde die LiChrosorb RP-18 (5 µm) LiChroCART 250-10 Säule (Merck Millipore) mit einem isokratischen Lösemittelgemisch (Acetonitril/Isopropanol; 2:1, v/v) und einer Flussrate von 4 ml/min genutzt. Die Dauer des Programms belief sich auf 30 min, wobei die Säule vor dem ersten Lauf auf 40 °C vorgewärmt und mindestens 30 min lang equilibriert wurde. Die organismenspezifischen HPLC-Methoden sind im Folgenden beschrieben.

Methode für *E. coli* und *S. oneidensis*

Der aus *E. coli*-Zellen gewonnene Chinon-Rohextrakt, wurde mit einem Laufmittel bestehend aus 70 % Methanol und 30 % Isopropanol bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. Die Trennung erfolgte isokratisch und dauerte 30 min pro Probe. Als Säule diente die OmniSpher 5 C18 150 x 4,6 mm Säule (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Der Säulenofen wurde auf 40 °C vorgeheizt und die Säule wurde vor der ersten Analyse mindestens 30 min equilibriert.

Methode für *W. succinogenes*

Der aus *W. succinogenes*-Zellen gewonnene Chinon-Rohextrakt wurde mit Laufmittel bestehend aus 100 % Methanol bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. Die Trennung erfolgte isokratisch und dauerte 30 min pro Probe. Als Säule diente die OmniSpher 5 C18 150 x 4,6 mm Säule (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Der Säulenofen wurde auf 40 °C vorgeheizt und die Säule wurde vor der ersten Analyse mindestens 30 min equilibriert.

Methode für *A. equolifaciens*

Der aus *A. equolifaciens*-Zellen gewonnene Chinon-Rohextrakt wurde mit einem Methanol/Isopropanol-Gradienten (0 % - 70 % Isopropanol) über 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. Als Säule diente die OmniSpher 5 C18 150 x 4,6 mm Säule (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Der Säulenofen wurde auf 40 °C vorgeheizt und die Säule wurde vor der ersten Analyse mindestens 30 min mit 100 % Methanol equilibriert.

6.5.3. Cyclische Voltammetrie von Chinonen

Die cyclische Voltammetrie ist ein elektrochemisches Verfahren zur Untersuchung von Elektronenübergängen. Bei dieser Methode wird das Startpotential mit einer konstanten Geschwindigkeit (Scanrate) bis zum Umkehrpotential geändert und anschließend wieder zum Startpotential zurückgeführt. Bei der Messung werden drei Elektroden benötigt (Drei-Elektroden-Anordnung). Die nicht polarisierbare Referenzelektrode dient als Nullpunkt. An der Arbeitselektrode wird die Untersuchung durchgeführt. An dieser Elektrode läuft die elektrochemische Reaktion ab, wodurch sich die Spannung zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode nach dem Ohmschen Gesetz ändert. Diese Änderung wird anschließend durch die Gegenelektrode ausgeglichen, indem von ihr ein Strom zur Arbeitselektrode fließt. Während des sogenannten Scans wird der Stromfluss in Form der Stromstärke gemessen und gegen die Spannung aufgetragen. Diese Spannung wird über ein Potentiostat gesteuert und durchläuft dabei mehrere Zyklen (2-20 Zyklen). Die cyclische Voltammetrie wurde mit dem

Multi-Potentiostat VMP2 (Princeton Applied Research) und einer Mikrozelle (Model K0264; Volumen: 5 ml) durchgeführt. Als Elektroden wurden eine Ag/AgCl Elektrode (Referenzelektrode), eine Platin Elektrode (Gegenelektrode) und eine Glas-Kohlenstoff Elektrode (Arbeitslektrode) genutzt. Die Arbeitslektrode wurde mit einer Scanrate von 20 mV/s in einem Bereich von 0 V bis -2,0 V betrieben. Die Chinone (5 - 10 mg) wurden in je 5 ml Acetonitril mit 0,1 M Tetrabutylammonium tetrafluoroborat (TBABF₄) gelöst. Als Software wurde EC-lab v6.81 genutzt.

6.5.4. Cyclische Voltammetrie von Proteinen

Für die Bestimmung des Redoxpotentials des Eisen-Schwefel-Zentrums im AeMenK-His Protein wurde ebenfalls die cyclische Voltammetrie genutzt. Die Experimente wurden mit dem Multi-Potentiostat VMP2 (Princeton Applied Research) und einem modifiziertem HPLC Vial durchgeführt (Abb. 25).

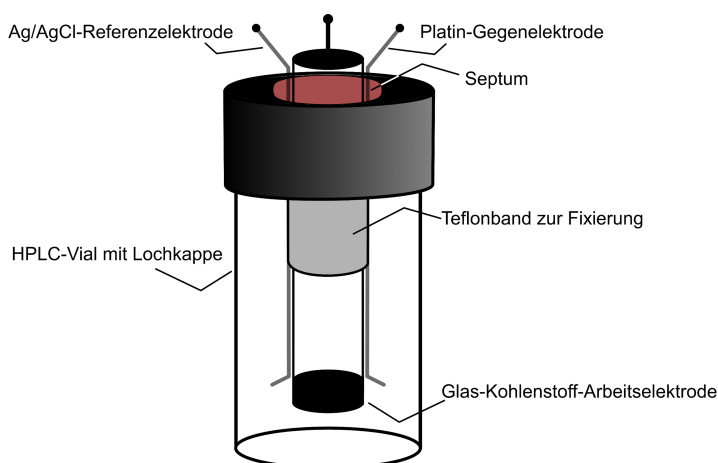


Abbildung 25 Schema der Messzelle zur Bestimmung des Redoxpotentials von Proteinen.

Die Probe (150 μ M von AeMenK-His in 150 μ l 3 M KCl pH 7,0) wurde im Anaerobier-Zelt bei 0 ppm Sauerstoff vorbereitet. Als Elektroden wurden eine Ag/AgCl Elektrode (Referenzelektrode), eine Platin Elektrode (Gegenelektrode) und eine Glas-Kohlenstoff Elektrode (Arbeitslektrode) genutzt. Die Arbeitslektrode wurde mit einer Scanrate von 100 mV/s in einem Bereich von 0,2 V bis -1,2 V betrieben. Es wurden insgesamt 20 Zyklen durchlaufen. Nur die stabilisierten Signale wurden für die Auswertung herangezogen. Die Werte wurden gegen eine Normal-Wasserstoffelektrode umgerechnet (+210 mV). Das System wurde zuvor gegen Eisen(III)-hexacyanidoferrat kalibriert. Als Software wurde EC-lab v6.81 genutzt.

6.5.5. NMR-Analyse

Die ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR Spektroskopie wurde mit einem 500 MHz DRX 500 Spektrometer (Bruker, BioSpin GmbH) aufgenommen. Die Chinone (jeweils 5 mg) wurden für die Messung in 200 μl deuteriertem Chloroform (CDCl_3 ; Sigma) gelöst.

6.5.6. Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Je 2 μg eines Chinons wurden in 100 μl Chloroform gelöst. Das Massenspektrum wurde mit dem Finnigan LCQ Deca LC/MS System (Thermo Scientific, Waltham) aufgenommen. Als Ionisierungsquelle wurde APCI (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck) mit einer Koronaentladung von 5 kV benutzt.

7. Strukturen und Redoxpotentiale methylierter Menachinon-Derivate

7.1. Struktur von Methylmenachinon-6

Wolinella succinogenes bildet Menachinon-6 und Methylmenachinon-6. Die exakte Position der zusätzlichen Methylgruppe am Methylmenachinon-6 war bisher nicht bekannt. Zur Bestimmung der Position wurden aus der Membran von *W. succinogenes* DSM 1740 zunächst beide Chinone mittels HPLC im Milligramm-Maßstab isoliert (Abb. 26).

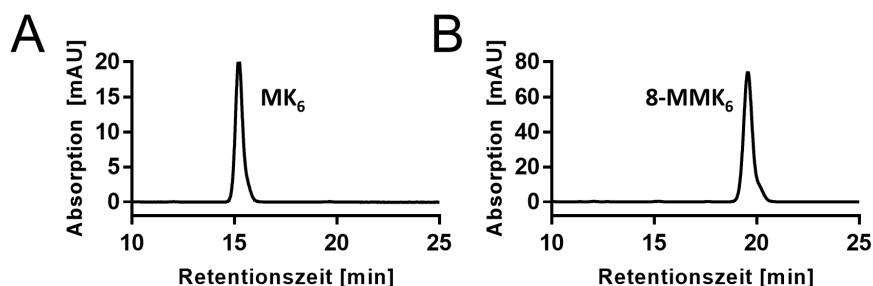


Abbildung 26 HPLC-Chromatogramme der gereinigten Chinone aus der Membran von *W. succinogenes*. (A) Menachinon-6, (B) Methylmenachinon-6. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben gereinigt und mit der *W. succinogenes* spezifischen HPLC-Methode analysiert (siehe Kap. 6.5.2).

Die Summenformeln beider Chinone MK_6 ($C_{41}H_{56}O_2$: Erwartet 580,427482 m/z ; Gefunden: 580,427621 m/z ; Fehler: -0,1 mDa) und MMK_6 ($C_{42}H_{58}O_2$: Erwartet 594,443133 m/z ; Gefunden: 594,442670 m/z ; Fehler: 0,5 mDa) wurden zunächst durch hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt. Anschließend wurden zur Bestimmung der Position der Methylgruppe von MMK_6 NMR-Spektren (1H -NMR, ^{13}C -NMR und $^1H,^{13}C$ -HMBC) aufgenommen.

Die Wasserstoffatome der beiden Methylgruppen des Naphthochinonsystems von Methylmenachinon-6 sind im 1H -Spektrum bei einer chemischen Verschiebung von 2,67 ppm und 2,09 ppm zu erkennen, welche sich in dem typischen Bereich von aromatischen $-CH_3$ Gruppen befinden. Da das Signal bei 2,67 ppm bei Menachinon-6 fehlt, ist davon auszugehen, dass dieses Signal der zusätzlichen Methylgruppe zugeschrieben werden kann (Abb. 27).

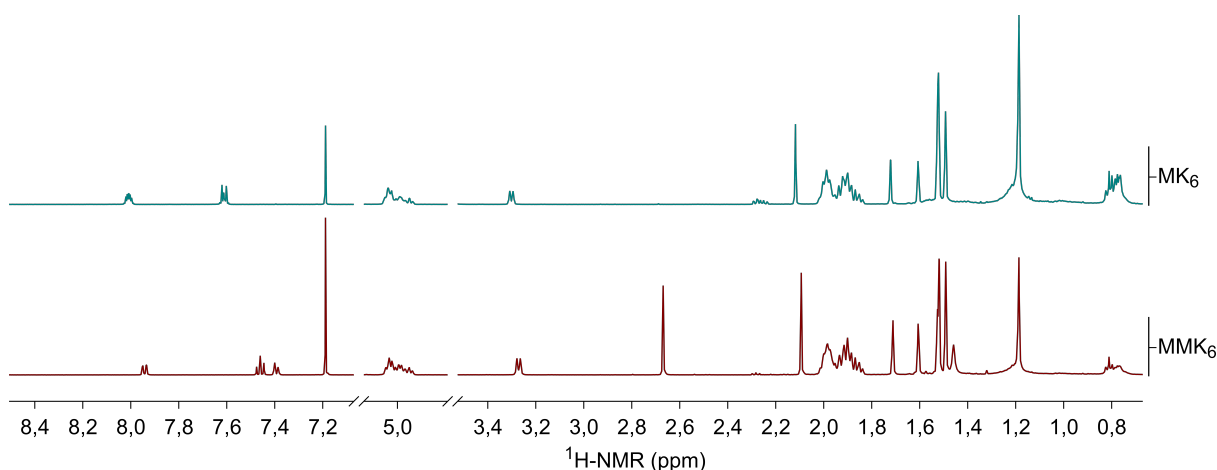


Abbildung 27 ¹H-NMR-Spektrum von Menachinon-6 (blau) und Methylmenachinon-6 (rot). Hauptunterschied ist das zusätzliche Singulett im MMK-Spektrum bei 2,67 ppm, welches durch die zusätzliche Methylgruppe an der Kopfgruppe des Chinons zustande kommt. Weitere Unterschiede sind im Bereich zwischen 7,3 und 8,0 ppm zu erkennen. Dies sind die Signale der aromatischen H-Atome an der Chinon-Kopfgruppe. Die genaue Zuordnung der Protonen ist im Anhang aufgelistet (Tab. 13).

Einen ersten Anhaltspunkt für die Position der zusätzlichen Methylgruppe geben die drei Signale zwischen 7,3 und 8,0 ppm im ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 28).

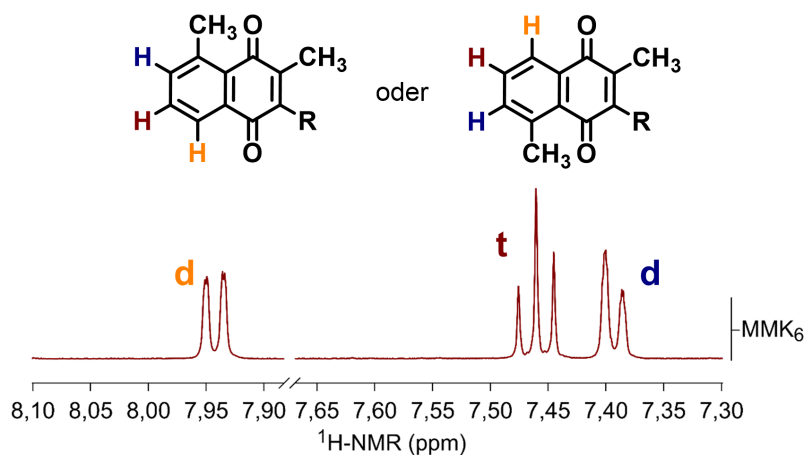


Abbildung 28 Aufspaltung der aromatischen Protonen des Methylmenachinons. Vergrößerter Ausschnitt des Spektrums von Methylmenachinon-6 (Abb. 27). Die Aufspaltung der drei Protonen in ein Duplett-Triplett-Duplett ist deutlich zu erkennen.

Jedes Signal spiegelt eines der aromatischen Protonen an der Kopfgruppe des Methylmenachinons wider. Läge die Position der Methylgruppe am Naphthochinon-System bei C-6 oder C-7, würde ein aromatisches Proton isoliert vorliegen und demnach ein singuläres Signal zeigen. Da die aromatischen Signale die Multiplizitäten von Duplett, Triplet und Duplett zeigen, kann ausgeschlossen werden, dass die Methylgruppe an Position C-6 oder C-7 liegt. Die Zuordnung der beiden Dupletts zu den jeweiligen Protonen wird begründet durch die Elektronen-ziehende Eigenschaft des chinoiden Systems. Das Proton, das am nächsten zum

Chinonsystem steht, wird am stärksten entschirmt und besitzt daher das Signal bei 7,94 ppm. Durch diese Aufspaltung ergeben sich die beiden einzigen möglichen Strukturen 5-Methylmenachinon-6 oder 8-Methylmenachinon-6. Ob sich die Methylgruppe an C-5 oder C-8 befindet wurde durch die sogenannte $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR Analyse überprüft, die die Detektion von Kopplungen von Wasserstoffatomen mit Kohlenstoffatomen über mehrere Bindungen ermöglicht. Ausgehend von den Carbonyl-Kohlenstoffatomen können die Bindungen zu den Protonen an den Positionen der Methylgruppe, die sich an C-5 oder C-8 befindet, den Protonen der Methylgruppe an Position C-2, sowie den Protonen des Kohlenstoffatoms an Position C-3 beobachtet werden. Der relevante Ausschnitt des $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrums ist in Abbildung 29 gezeigt.

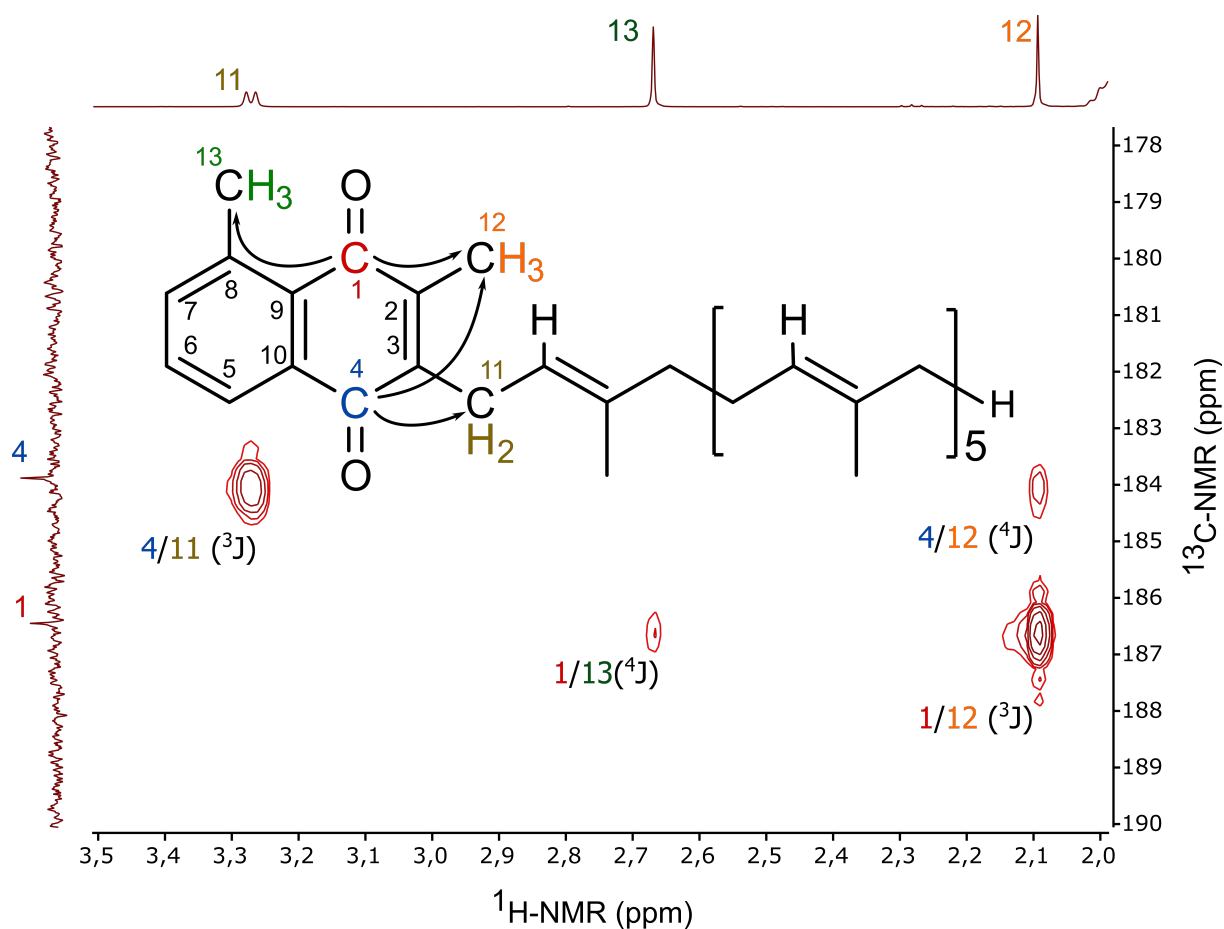


Abbildung 29 Ausschnitt des $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrums von Methylmenachinon-6 zur Bestimmung der Position der Methylgruppe an der Chinonkopfgruppe. Gezeigt sind die vicinalen Kopplungen (^3J) und die Long-Range Kopplungen (^4J) von den Carbonyl-Kohlenstoffatomen C-4 und C-1 zu den benachbarten Wasserstoffatomen. Deutlich zu erkennen ist das Kreuzsignal vom Kohlenstoffatom C-1 zu den Wasserstoffatomen am Kohlenstoffatom C-13. Dies bestätigt die Position der Methylgruppe am Kohlenstoffatom C-8.

Im dargestellten Bereich sind zwei Signale bei einer chemischen Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ von 2,17 ppm zu erkennen. Diese Signale zeigen die Kopplung der Protonen der Methylgruppe C-12 zu den beiden Carbonyl-Kohlenstoffatomen C-4 und C-1. Auf der Höhe von 186,74 ppm sind alle Kopplungen zum Kohlenstoffatom C-4 zu erkennen. Neben dem im $^1\text{H-NMR}$ beschriebenen Signal bei 2,17 ppm ($4/12$ (4J)) ist ein weiteres Signal bei 3,35 ppm ($4/11$ (3J)) zu erkennen. Dieses Signal zeigt die Kopplung von C-4 zu den Protonen von C-11 der Isoprenylseitenkette. Das letzte der vier Signale ($1/13$ (4J)) ist bei 2,74 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu erkennen und liegt auf derselben Höhe wie das $1/12$ (3J) Signal und kann daher als Kopplung des Carbonyl-Kohlenstoffatoms C-1 zu den Protonen der zusätzlichen Methylgruppe des Methylmenachinons zugeordnet werden. Da kein zusätzliches Kreuzsignal bei 2,74/186,74 ppm zu detektieren ist, befindet sich die Methylgruppe an Position C-8. Das Methylmenachinon von *W. succinogenes* ist daher 8-MMK₆.

7.2. Struktur von Dimethylmenachinon-6

Neben der monomethylierten Form des Menachinons, wurde eine dimethylierte Form unter anderem in dem Actinobakterium *Adlercreutzia equolifaciens* DSM 19450 beschrieben (Maruo *et al.*, 2008). *A. equolifaciens* DSM 19450 wurde in 200 ml WC-Medium kultiviert (Kap. 6.2.3). Nach einer Kultivierungsdauer von 16 h bei 37 °C wurde die Chinon-Komposition mittels HPLC analysiert und mit der von *W. succinogenes* DSM 1740 verglichen (Abb. 30).

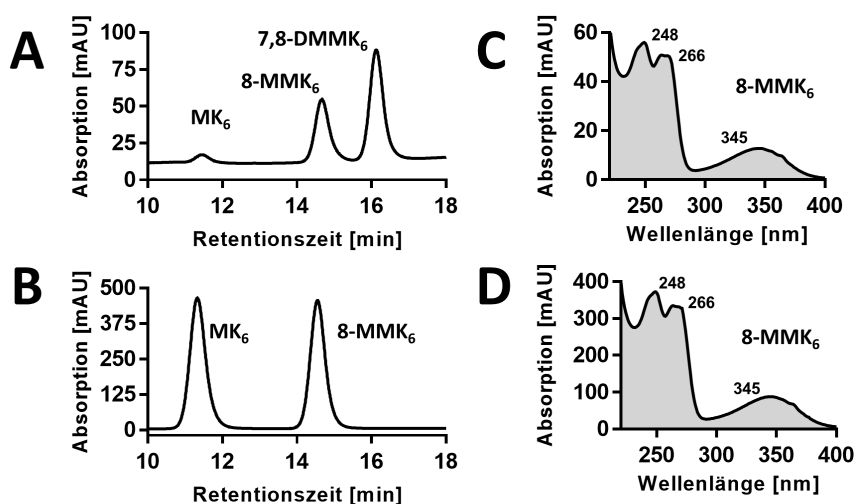


Abbildung 30 Vergleich der Chinonprofile von *A. equolifaciens* und *W. succinogenes*. (A), Chinonprofil von *A. equolifaciens* DSM 19450. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *A. equolifaciens* spezifischen HPLC-Methode analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm. (B), Chinonprofil von *W. succinogenes* DSM 1740. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *W. succinogenes*-spezifischen HPLC-Methode analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm. (C), UV-Vis Spektrum des 8-MMK₆ aus Abb. 30A mit einer Retentionszeit von 14,9 min. (D), UV-Vis Spektrum des 8-MMK₆ aus Abb. 30C mit einer Retentionszeit von 14,9 min.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Chinone des kettenbildenden stäbchenförmigen Bakteriums *A. equolifaciens* dieselbe Isoprenseitenkettenlänge besitzen wie die von *W. succinogenes* ($n = 6$) (Maruo et al., 2008). Daher ist die Retentionszeit von Menachinon-6 und Methylmenachinon-6 für die Chinone der beiden Organismen dieselbe. Auch die UV/VIS-Spektren der Chinone MK₆ und 8-MMK₆ von *A. equolifaciens* sind identisch zu den Spektren der Chinone aus *W. succinogenes* (Abb. 30 C und D zeigen exemplarisch die Spektren von 8-MMK₆). Bei einer Retentionszeit von 16,3 min erkennt man im Chinonprofil von *A. equolifaciens* eine dritte Substanz (Abb. 30A). Aufgrund der längeren Retentionszeit gab es Grund zur Annahme, dass es sich hier um die dimethylierte Form von Menachinon-6 handelt. Die genaue Struktur von DMMK₆ war nicht bekannt, jedoch zeigten die Arbeiten von Collins et al. (1985) durch NMR Analysen, dass sich beide Methylgruppen in ortho-Stellung befinden müssen und es sich daher entweder um 5,6-DMMK₆ oder 7,8-DMMK₆ handelte. Da es sich bei dem einfach methylierten Chinon um 8-MMK₆ handelt, war die Existenz von 7,8-DMMK₆ wahrscheinlich. Zur Bestätigung der Struktur wurde DMMK₆ mittels HPLC isoliert. Die Isolierung der Chinone erfolgte jedoch nicht aus Membranen von *A. equolifaciens* DSM 19450, sondern wurde wegen der einfacheren Kultivierbarkeit und höheren Ausbeute aus dem DMMK₆-produzierenden Stamm *W. succinogenes* *napA::cat* AeMenK2 isoliert (für weitere Erläuterungen siehe Kap. 8). Dieser Stamm produzierte neben MK₆, 8-MMK₆ und DMMK₆ ein weiteres bisher unbekanntes Chinon, bei dem es sich vermutlich um 7-MMK₆ handelte. Dieses wurde ebenfalls gereinigt und analysiert (Abb. 31).

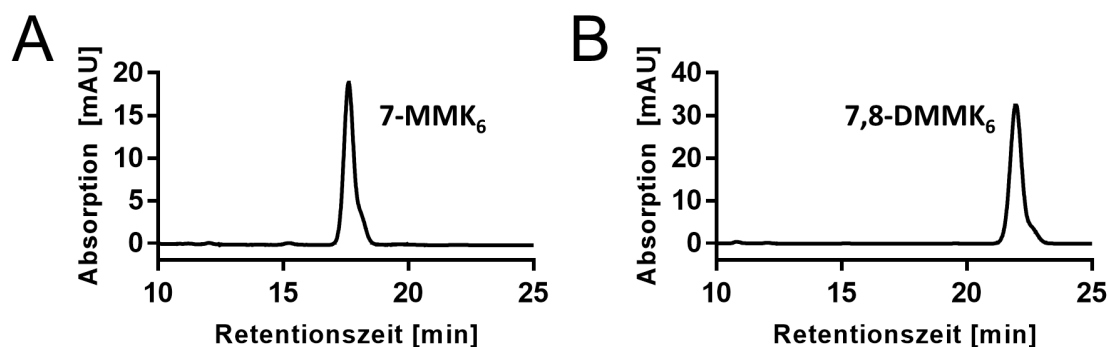


Abbildung 31 HPLC-Chromatogramme gereinigter Chinone aus *W. succinogenes* *napA::cat* AeMenK2. (A), 7-Methylmenachinon-6. (B), 7,8-Dimethylmenachinon-6. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben gereinigt und mit der *W. succinogenes*-spezifischen HPLC-Methode analysiert.

Je 50 μg Chinon wurden zur Analyse mittels HR-APCI-MS und je 3 mg Chinon zur Analyse mittels NMR gegeben. Die HR-Massenanalyse ergab, dass es sich bei dem Chinon mit einer Retentionszeit von 18 min um eine weitere monomethylierte Form des Menachinon-6 handelt ($\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_2$: Erwartet: 594,4431 m/z ; Gefunden: 594,4421 m/z ; Fehler: 1 mDa) und beim Chinon mit einer Retentionszeit von 22,5 min um eine dimethylierte Form von Menachinon-6 ($\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{O}_2$: Erwartet: 608,4588 m/z ; Gefunden: 608,4581 m/z ; Fehler: 0,7 mDa). Die Anzahl der Methylgruppen am Naphthochinonsystem wurde zudem durch ^1H -NMR bestätigt (Abb. 32). Hier ist zu erkennen, dass das Singulett bei ca. 2,08 ppm in allen Chinonspezies vorkommt und damit der C-2 Methylgruppe des jeweiligen Naphthochinons entspricht.

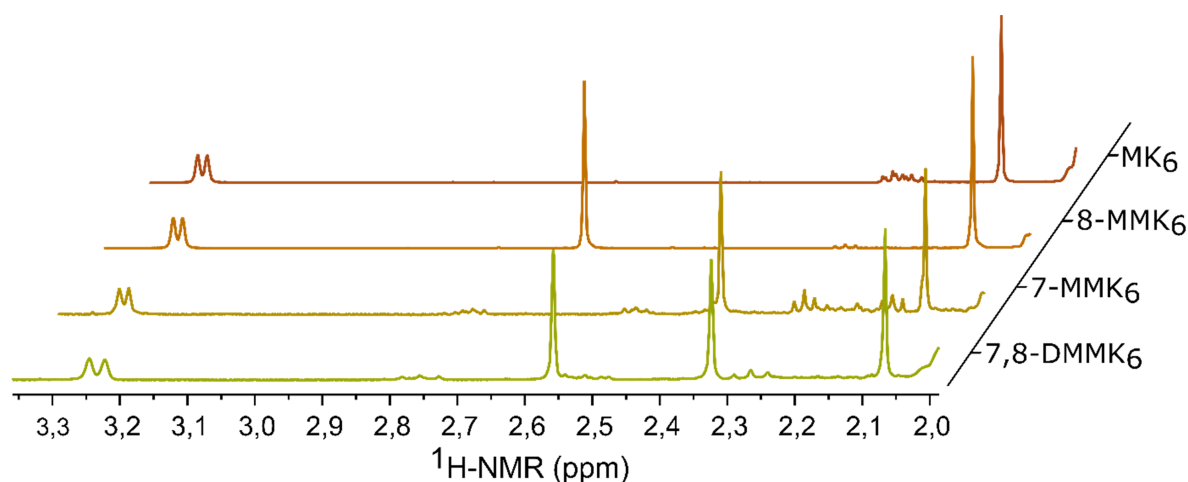


Abbildung 32 Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der angegebenen Menachinon-Spezies im Bereich von 2,0 bis 3,35 ppm. Im Bereich von 2,0 bis 2,6 ppm sind die Protonen der Methylgruppen des Chinonsystems als singuläre Signale zu erkennen. Durch die Anzahl der singulären Signale ist es möglich die Anzahl der Methylgruppen abzuleiten. Die genauen Zuordnungen der Protonen sind im Anhang aufgelistet (Tab. 13).

Im Spektrum des zweiten monomethylierten MK_6 ist ein weiteres Singulett bei 2,48 ppm zu erkennen. Dieses entspricht ebenfalls einer Signalintensität von 3 Protonen. Im Vergleich zu der C-8 Methylgruppe von 8-MMK₆ bei 2,67 ppm ist dieses Signal weniger entschirmt. Dies spricht für eine Methylierung des C-Atoms C-6 oder C-7, da diese von den Ketogruppen des Chinonsystems weiter entfernt sind als C-5 oder C-8. Ein weiteres Indiz für die Methylierung an Position C-6 oder C-7 ist im aromatischen Bereich des jeweiligen ^1H -NMR Spektrums zu erkennen (Abb. 33A).

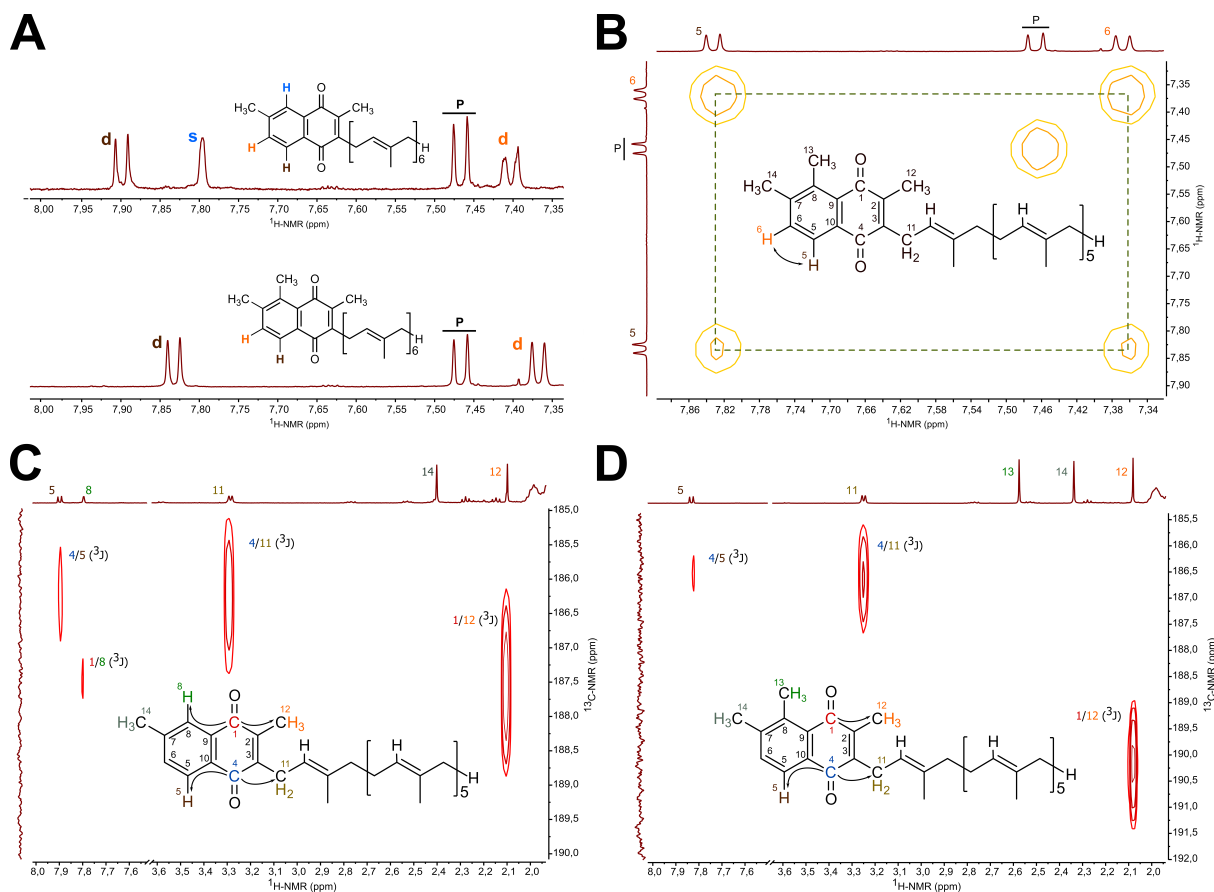


Abbildung 33 Bestimmung der Methylgruppenposition von 7-MMK₆ und 7,8-DMMK₆. (A), ¹H-NMR-Spektrum von 7-MMK₆ und 7,8-DMMK₆ im Bereich von 7,35 bis 8,00 ppm. (B), ¹H,¹H-COSY-NMR von 7,8-DMMK₆ im Bereich von 7,35 bis 8,00 ppm. (C), Ausschnitt des ¹H,¹³C-HMBC-NMR von 7-MMK₆. (D), Ausschnitt des ¹H,¹³C-HMBC-NMR von 7,8-DMMK₆. Gezeigt sind die vicinalen Kopplungen (³J) der Carbonyl-Kohlenstoffatome C-4 und C-1 zu den benachbarten Wasserstoffatomen. Die genauen Zuordnungen der Protonen sind im Anhang aufgelistet (Tab. 13). P: Verunreinigung.

Das Duplett bei 7,46 ppm in beiden Spektren wurde einer Verunreinigung zugeordnet, da es in keinem der 2D-Spektren mit einem Signal der Chinone koppelt. Zwei weitere Signale sind jeweils als Dupletts aufgespalten. Dies deutet darauf hin, dass in direkter Nachbarschaft ein weiteres Proton liegt. Das Kreuzsignal der Dupletts im ¹H,¹H,-COSY-NMR von 7,8-DMMK₆ zeigt genau diese direkte Nachbarschaft der Protonen (Abb. 33B). Zudem sind beide Dupletts im putativen 7,8-DMMK₆ in ¹H-NMR Spektren abgeschirmt als im ¹H-NMR Spektrum des monomethylierten Chinons. Dies liegt daran, dass die zusätzliche Methylgruppe einen positiven induktiven Effekt auf das Naphthochinonsystem ausübt und damit die gesamte Kopfgruppe „elektronenreicher“ ist. Im ¹H-NMR Spektrum des vermeintlichen 7-MMK₆ ist neben den drei beschriebenen Signalen noch ein weiteres Signal ohne eine Aufspaltung zu erkennen. Dieses Singulett deutet auf ein isoliertes Proton hin und bestätigt damit zusätzlich zum COSY-Experiment die Annahme, dass sich die Methylgruppe an Position C-6 oder C-7 befinden muss. Die endgültige Bestätigung, dass es sich bei den isolierten Chinonen um 7-MMK₆ und

7,8-DMMK₆ handelte, lieferten die zugehörigen ¹H,¹³C-HMBC Spektren (Abb. 33C und D). Die beobachteten ³J-Kopplungen vom C-Atom 4 zu den Protonen an C-Atom 5 und C-Atom 11 sind in beiden Ausschnitten der ¹H,¹³C-HMBC Spektren identisch. Zudem ist die ³J-Kopplung von C-Atom 1 zu den Protonen an C-Atom 12 ebenfalls in beiden Fällen zu erkennen. Der einzige Unterschied im dargestellten Ausschnitt des 7-MMK₆ HMBC Spektrums zum Ausschnitt des 7,8-DMMK₆ HMBC Spektrums ist die ³J-Kopplung vom C-Atom 1 zu dem Proton am Kohlenstoffatom C-8. Da dieses H-Atom im ¹H-NMR-Spektrum ein singuläres Signal zeigt und damit keine benachbarten H-Atome besitzt, ist es ein klares Indiz dafür, dass die Methylierung an Position C-7 des Menachinons bzw. 8-Methylmenachinons erfolgte.

7.3. Bestimmung der Redoxpotentiale der methylierten Menachinone

Zur Einschätzung der Redoxaktivität wurden die gereinigten Chinone mittels Cyclovoltammetrie elektrochemisch untersucht. Um die Elektronenübergänge besser beurteilen zu können, wurde das polar-aprotische Lösungsmittel Acetonitril genutzt, da in protischen Lösemitteln wie Ethanol oder Wasser der Übergangszustand des radikalischen Semichinon-Anions nicht beobachtet werden kann. Für die Messung wurden die Chinone in Elektrolytlösung aufgenommen und die Messungen wie in Kapitel 6.5.3 beschrieben durchgeführt. Ausgehend vom Voltammogramm wurden die Signalpotentiale (E_{pa} und E_{pc}) beider Elektronenübergänge bestimmt und die Halbstufenpotentiale ($E_{1/2}$) berechnet (Abb. 34).

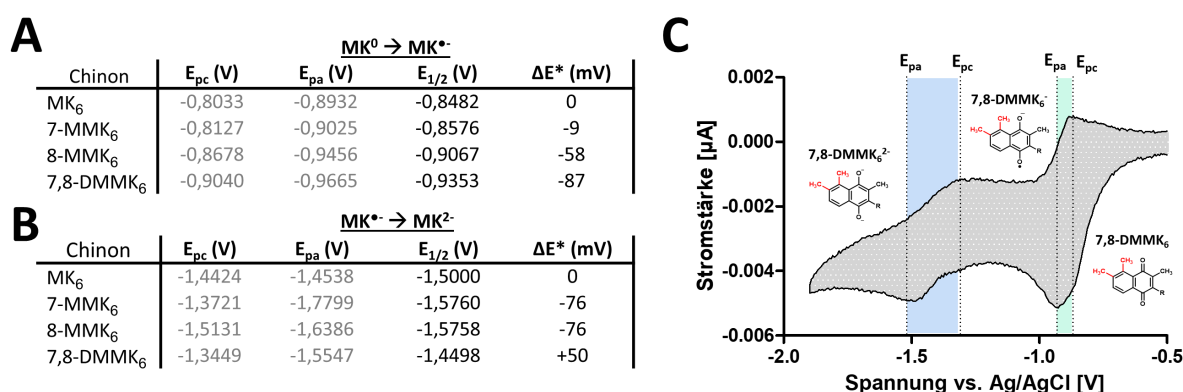


Abbildung 34 Redoxpotentiale von Menachinon und dessen methylierter Derivate (je 1 mg/ml, gemessen in Acetonitril). Die Chinone wurden aus *W. succinogenes napA::cat AeMenK2 kan* isoliert (siehe Kap. 7.1). (A), Potentiale für den ersten Reduktionsschritt vom Chinon zum radikalischen Semichinon-Anion. (B), Potentiale für den zweiten Reduktionsschritt vom Semichinon-Anion zum Chinol-Dianion. Die Voltammogramme wurden mit dem internen Standard Ferrocen kalibriert (Redoxpotential: +400 mV). (C), Repräsentatives cyclisches Voltammogramm von 7,8-Dimethylmenachinon-6 mit den jeweiligen Redoxstadien von 7,8-DMMK₆ (oxidiert, neutral), 7,8-DMMK₆^{•-} (radikalisches Semichinon-Anion) und 7,8-DMMK₆²⁻ (vollständig reduziertes Dianion). ΔE^* gibt die Redoxpotential-Differenz zwischen MK₆ und dem jeweiligen Chinon an. E_{pa} , Anodisches Signalpotential; E_{pc} , Kathodisches Signalpotential, $E_{1/2}$, Halbstufenpotential (Redoxpotential).

Um die methylierten Menachinone miteinander zu vergleichen, wurde jeweils die Differenz zum Redoxpotential des Menachinons gebildet (Abb. 34A,B). Für den ersten Reduktionsschritt besitzen die methylierten Chinone stets ein niedrigeres Redoxpotential als Menachinon-6. 7,8-DMMK₆ ist hier mit einer Redoxpotentialdifferenz zum Menachinon-6 von -87 mV das Chinon mit dem niedrigsten Potential. Für das zweite Potential ist zu erkennen, dass die monomethylierten Menachinone mit einer Differenz von jeweils -76 mV ein niedrigeres Potential besitzen als Menachinon-6. Überraschend ist jedoch, dass 7,8-DMMK₆ für den Reduktionsschritt vom radikalischen Semichinon-Anion zum komplett reduzierten Dianion ein um 50 mV positiveres Redoxpotential besitzt als MK₆.

Durch die Bildung der Differenz beider Halbstufenpotentiale ist es möglich, die Gleichgewichtskonstante der Redoxreaktion zu bestimmen (Martínez-Cifuentes *et al.*, 2017). Eine hohe Gleichgewichtskonstante weist auf ein stabileres radikalisches Semichinon-Anion hin. Die Berechnung erfolgte mit der Formel: $\ln K = F/RT * (\Delta E_{1/2})$, wobei F die Faraday-Konstante, R die ideale Gaskonstante und T die Temperatur darstellt. Tabelle 9 zeigt die berechneten Gleichgewichtskonstanten.

Tabelle 9 Differenz der Halbstufenpotentiale und berechnete Gleichgewichtskonstanten der Chinone.

Chinone	$\Delta E_{1/2}$ (V)	$\ln K$	K
MK ₆	0,6518	25,8	$1,6 * 10^{11}$
7-MMK ₆	0,7184	28,5	$2,4 * 10^{12}$
8-MMK ₆	0,6691	26,5	$3,2 * 10^{11}$
7,8-DMMK ₆	0,5145	20,4	$7,2 * 10^8$

Aus Tabelle 9 wird ersichtlich, dass 7,8-DMMK₆ die kleinste Konstante ($\ln K = 20,4$) besitzt. Damit weist 7,8-DMMK₆ das instabilste radikalische Semichinon-Anion auf und wird folglich am schnellsten zum Dianion reduziert. 7-MMK₆ dagegen, zeigt mit einer Konstante von $\ln K = 28,5$ das stabilste radikalische Semichinon-Anion.

7.4. Diskussion

7.4.1. Struktur von Methylmenachinon-6 aus *W. succinogenes*

Die Struktur von Methylmenachinon-7 aus *Shewanella putrefaciens* IAM 12079 wurde 1985 mithilfe einer ^1H -NMR gelöst (Itho *et al.*, 1985). Die Aufklärung der Struktur gelang den Forschern damals durch die Modifikation der Chinone Phyllochinon und Methylmenachinon-7 zum jeweiligen Chromenylacetat oder Chromenol. Durch den Vergleich der ^1H -Spektren der Chromenylacetate und Chromenole konnten Itho *et al.* (1985) die exakten Positionen der Protonen an C-8 und C-7 bestimmen und ebenfalls die Position der zusätzlichen Methylierung an Position 8 festlegen. Neben der Arbeit von Itho *et al.* (1985) wurde 2001 die Struktur von Methylmenachinon-7 aus *Thermoplasma acidophilum* HO-62 veröffentlicht (Shimada *et al.*, 2001). Shimada *et al.* (2001) nutzten das damals neu entwickelte 2D-NMR verfahren ^1H , ^{13}C -HMBC, wodurch die Modifikation des Chinons nicht mehr notwendig war. Durch die ^3J -Kopplung des Kohlenstoffatoms C-1 zu den Protonen der Methylgruppe vom C-2, sowie der ^4J -Kopplung der Protonen der zusätzlichen Methylgruppe zu C-1, konnte die Position der Methylgruppe an C-8 determiniert werden.

In diesem Kapitel sollte im Kapitel 7.1 auf identische Weise die Position der Methylgruppe von Methylmenachinon-6 aus *W. succinogenes* bestimmt werden. Der Vergleich der ^1H -NMR Spektren von MMK_6 und MK_6 zeigte deutlich das zusätzliche Singulett im ^1H -NMR von MMK_6 . Das von Shimada *et al.* (2001) veröffentlichte ^1H -NMR Spektrum von 8- MMK_7 aus *T. acidophilum* zeigt die identischen Signale wie das von MMK_6 aus *W. succinogenes*. Diese Übereinstimmung und die exakte Masse von 594,442670 m/z mit der Summenformel von MMK_6 , sowie die Ergebnisse aus dem ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR Spektrum bestätigten die Position der Methylgruppe vom MMK_6 am Kohlenstoffatom C-8.

7.4.2. Struktur von Dimethylmenachinon-6

Neben der Strukturaufklärung von 8- MMK_6 , sollte die Struktur von DMMK_6 , einem in Spezies der Klasse Coriobacteria verbreiteten Menachinon-Derivat, bestimmt werden. Da die Isolation von DMMK_6 im Milligramm-Maßstab aus *A. equolifaciens* DSM 19450 aufgrund der anspruchsvollen Kultivierbarkeit schwer zu bewerkstelligen war, wurde das DMMK_6 und ein weiteres zuvor unbekanntes Monomethylmenachinon aus dem in Kapitel 8 erstellten DMMK -produzierenden *W. succinogenes* Stamm isoliert. Das zweite MMK_6 wurde bisher in keinem anderen DMMK_6 produzierenden Mikroorganismus beschrieben und unterscheidet sich in der Retentionszeit und im UV-Vis Spektrum vom 8- MMK_6 . Über die Struktur von DMMK_6 war

bisher nur bekannt, dass die beiden Methylgruppen benachbart vorliegen müssen (Collins *et al.*, 1985). Daher wurde vermutet, dass es sich hierbei um das 7,8-DMMK₆ und beim zweiten Monomethylmenachinon um 7-MMK₆ handelt. Im COSY-NMR von 7,8-DMMK₆ konnte die Aussage von Collins und Kollegen bestätigt werden, da hier das Kreuzsignal der aromatischen Protonen an den Kohlenstoffatomen C-6 und C-5 detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis kombiniert mit den ¹H, ¹³C-HMBC-NMR Spektren und den Daten von Collins *et al.* (1985) deutet eindeutig auf eine zusätzliche Methylierung am Kohlenstoffatom C-7 hin.

7.4.3. Redoxpotentiale der methylierten Menachinone

Aus den bestimmten Redoxpotentialen wurde ersichtlich, dass mit der Methylierung das Redoxpotential für die Reduktion zum radikalischen Semichinon Anion negativer wird. Des Weiteren fiel auf, dass die Methylierung von Position 8 einen stärkeren Einfluss auf das Redoxpotential hat als die Methylierung von Position 7 (Abb. 34). Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits von Schmid *et al.* (1999) beschrieben. Deren Arbeit zeigte, dass das Redoxpotential gemessen in DMF von 8-Methylmenachinon mit $E_{1/2} = -1295$ mV um 40 mV negativer war, als das von 7-Methylmenachinon ($E_{1/2} = -1255$ mV). Das Redoxpotential für 7,8-DMMK₆ hingegen war hier um 50 mV positiver als das Redoxpotential von MK₆ und deutet auf ein instabiles radikalische Semichinon-Anion hin. Diese Hypothese wurde durch die Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten der Zwei-Elektronenreduktionen überprüft. Die Konstante von 7,8-DMMK₆ ist mit einem $\ln K$ von 20,4 die mit Abstand kleinste Konstante und spricht damit für das instabilste Semichinon-Anion. Die Ergebnisse zeigen, dass 7,8-DMMK₆ das negativste Redoxpotential der hier verglichenen Chinone besitzt und damit das redox-negativste natürlich vorkommende Menachinon ist, das in der Literatur bislang beschrieben wurde. Dabei ist jedoch anzumerken, dass das *in vitro* bestimmte Redoxpotential nicht mit dem *in situ* Redoxpotential übereinstimmen muss, da bei der *in vitro* Messung die Interaktion des Chinons mit dem Chinon-Bindezentrum des jeweiligen Proteins vernachlässigt wird, welche ebenfalls einen Einfluss auf das Redoxpotential ausüben kann (Woodbury *et al.*, 1985).

8. Biosynthese der methylierten Menachinon-Derivate

8.1. Heterologe Produktion von MqnK aus *W. succinogenes* in *E. coli*

Das Produkt des *mqnK*-Gens von *W. succinogenes* DSM 1740 (Genlokus: *ws0113*) wurde in früheren Arbeiten als vermeintliche Menachinon-Methyltransferase identifiziert (siehe Einleitung, Kapitel 4.2.1). Zur weiteren Charakterisierung wurde das *mqnK* Gen zunächst mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA3 kloniert. Nach der Einbringung des resultierenden Plasmids pWs-mqnK-Strep in *E. coli* XL-1 Blue, wurde das Protein produziert und mittels Immunodetektion nachgewiesen. Anschließend wurde der Chinonpool von *E. coli* XL-1 Blue pWs-mqnK-Strep mittels HPLC analysiert und mit dem von *E. coli* XL-1 Blue verglichen (nicht gezeigt). Da keine Veränderung zum Chinonprofil von *E. coli* XL-1 Blue zu erkennen war, wurde vermutet, dass das Protein MqnK in *E. coli* nicht aktiv ist (M. Kern und J. Simon, nicht veröffentlicht). Als Alternative wurde in dieser Arbeit ein weiteres Expressionssystem basierend auf dem IPTG-induzierbaren T7-Promotor getestet. Das mittels pWs-mqnK-Strep amplifizierte *mqnK*-Fragment wurde mithilfe der CPEC-Methode in den Vektor pACYC-Duet ligiert. Der entstandene Vektor pAC-WsMqnK wurde in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Nach der in Kapitel 6.4.10 beschriebenen Produktion des Proteins wurden die Chinone aus *E. coli* BL21(DE3) pAC-WsMqnK isoliert und analysiert. Im Chinonprofil wurden anhand des UV/VIS-Spektrums von 8-MMK₆ aus *W. succinogenes* bei einer RT von 14,9 min geringe Mengen an 8-Methylmenachinon-8 identifiziert (Abb. 35).

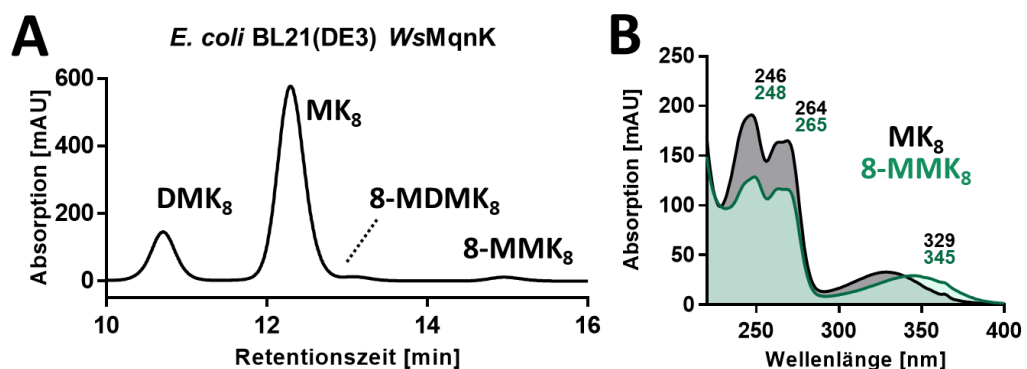


Abbildung 35 Analyse des Chinonsprofils von *E. coli* BL21(DE3) pAC-WsMqnK. (A), Chinonprofil von *E. coli* BL21(DE3) pAC-WsMqnK. Die Zellen wurden in 500 ml TB-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Chinone wie beschrieben isoliert und mit der *E. coli* spezifischen Chinon-HPLC Methode analysiert (Kap. 6.5.2). Dargestellt ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($r=2$). (B), UV-Vis Spektren der Analyten mit den Retentionszeiten 12,4 min (MK₈) und 14,9 min (8-MMK₈). Die Verschiebung des langwelligigen Maximums um ca. 15 nm ist analog zu dem der Chinone MK₆ und 8-MMK₆ (Hein *et al.*, 2017a).

8.2. Charakterisierung der Menachinon-Methyltransferasen MenK aus *Adlercreutzia equolifaciens* und *Shewanella oneidenis*

S. oneidenis MR-1 und *A. equolifaciens* DSM 19450 nutzen beide den klassischen Menachinon-Biosyntheseweg und wurden als 8-MMK-Produzenten beschrieben (Tab. 14 im Anhang zeigt eine Zusammenstellung aller beschriebenen MMK-produzierenden Organismen).

BLAST-Analysen mit *W. succinogenes* MqnK zeigten, dass die Genome beider Organismen jeweils ein Protein kodieren, das zu 49 % (*S. oneidenis* MR-1; Genlokus: SO4520) bzw. 44 % (*A. equolifaciens* DSM 19540; Genlokus: Aeq0025) mit MqnK identisch ist. Aufgrund der MK-Biosynthese nach dem klassischen Menachinon-Biosyntheseweg wurden diese Gene nicht MqnK, sondern MenK genannt. Zur Bestätigung, dass die beiden *menK* Gene ebenfalls Menachinon-Methyltransferasen kodieren, wurden beide Gene aus den jeweiligen Genomen mittels PCR amplifiziert, wie bereits oben für das *mqnK* Gen beschrieben, in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und in *E. coli* BW25113 exprimiert (Produkte: SoMenK bzw. AeMenK). In den Absorptionsspektren der aufgetrennten Chinonspezies aus den jeweiligen *E. coli*-Zellen ist neben den für *E. coli* BW25113 typischen Chinonen DMK₈ und MK₈ nach einer Retentionszeit von 24,8 min ein weiteres Chinon zu erkennen (Abb. 36A-C), das mit Hilfe des UV/VIS-Spektrums als 8-MMK₈ identifiziert wurde (Abb. 36D-E).

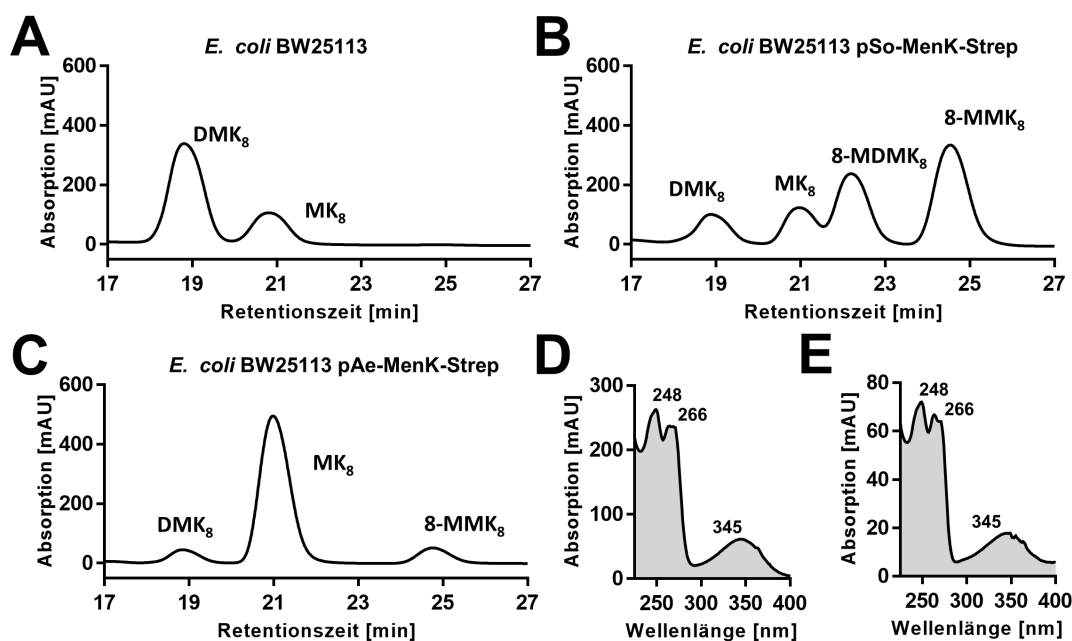


Abbildung 36 Analyse der Chinonprofile von verschiedenen *E. coli* BW25113 Stämmen. (A), Chinonprofil von *E. coli* BW25113. (B), Chinonprofil von *E. coli* BW25113 pSo-MenK-Strep. (C), Chinonprofil von *E. coli* BW25113 pAe-MenK-Strep. Die Zellen wurden in je 500 ml TB-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Chinone wie beschrieben isoliert und mit der allgemeinen Chinon-HPLC Methode analysiert (Kapitel 6.5.2). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($n=5$). (D), UV-Vis Spektren der Analyten mit den Retentionszeiten 24,8 min (8-MMK₈) des Chinonprofils aus (B). (E), UV-Vis Spektren der Analyten mit den Retentionszeiten 24,8 min (8-MMK₈) des Chinonprofils aus (C).

Ein zweites zusätzliches Signal (RT: 22,4 min) ist im Chinonprofil von *E. coli* BW25113 pSo-menK-Strep zu erkennen. Das zugehörige Absorptionsspektrum ist in Abbildung 37 gezeigt.

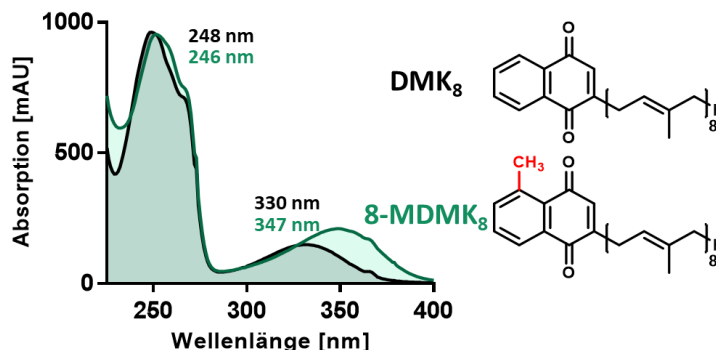


Abbildung 37 UV-VIS-Spektren von 2-Demethylmenachinon-8 (DMK₈) und 8-Methyl-2-Demethylmenachinon-8 (8-MDMK₈). Für die Spektren wurden die Analyten aus dem in Abb. 36B gezeigten Chromatogramm bei den Retentionszeiten 18,9 min und 22,4 min extrahiert. Schwarz, DMK₈; Grün 8-MDMK₈.

Mittels MS wurde für dieses Chinon eine Masse von 717,3 m/z bestimmt. Dies entspricht der Masse von Menachinon-8. Da Menachinon-8 jedoch bei dieser HPLC-Methode eine RT von 21,0 min besitzt und DMK₈ in *E. coli* ebenfalls in signifikanten Mengen vorkommt (Abb. 36A), wurde vermutet, dass es sich um C-8 methyliertes DMK₈ (8-MDMK₈) handelte. Zur Überprüfung dieser These wurde der *ubiE*-defiziente Stamm *E. coli* JW5581 aus der Keio-Collection verwendet (Baba *et al.*, 2006). UbiE katalysiert in der Menachinon-Biosynthese die Methylierung des C-2 Atoms von MK-8 (Young *et al.*, 1971). Die entsprechende Deletionsmutante produziert daher kein Menachinon und weist im Chinonprofil nur DMK₈ (Abb. 38A) auf.

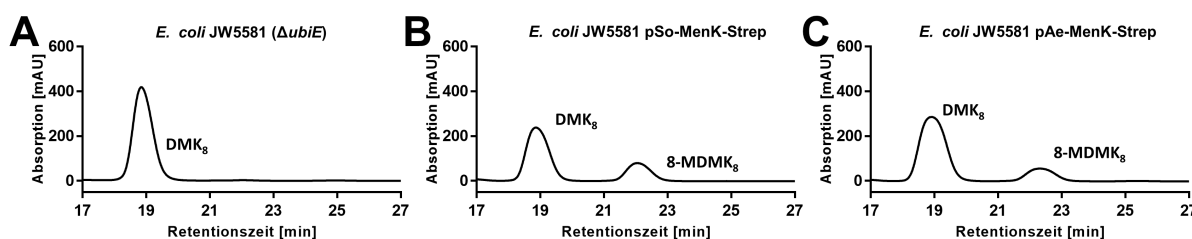


Abbildung 38 Analyse der Chinonprofile von verschiedenen *E. coli* JW5581 Stämmen. (A), Chinonprofil von *E. coli* JW5581. (B), Chinonprofil von *E. coli* JW5581 pSo-MenK-Strep. (C), Chinonprofil von *E. coli* JW5581 pAe-MenK-Strep. Die Zellen wurden in je 500 ml TB-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Chinone wie beschrieben isoliert und mit der allgemeinen Chinon-HPLC Methode analysiert (Kap. 6.5.2). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($n=5$).

Durch die Produktion der Menachinon-Methyltransferasen SoMenK und AeMenK in den Stämmen *E. coli* JW5581 pSo-menK-Strep und *E. coli* JW5581 pAe-menK-Strep wurde gezeigt, dass die Methylierung von DMK₈ zu 8-MDMK₈ möglich ist (Abb. 38B,C). Zur Verifizierung der Bildung von 8-MDMK₈ wurde das Chinon aus einer *E. coli* JW5581 pAe-menK-Strep-Kultur mittels HPLC gereinigt und durch NMR analysiert (Abb. 39). Beim Vergleich der ¹H-NMR Spektren von 8-MMK₆ und MK₆ mit dem ¹H-NMR Spektrum von 8-MDMK₈ ist deutlich zu erkennen, dass das singuläre Signal zwischen 2,0 und 2,2 ppm fehlt (Abb. 39A). Dieses Signal wird von den drei H-Atomen der Methylgruppe am C-Atom 2 erzeugt, welche in 8-MMK₆ und 8-MK₆ zu finden sind. Im Fall von 8-MDMK₈ fehlt diese Methylgruppe, wodurch auch kein Signal zwischen 2,0 ppm und 2,2 ppm zustande kommt. Stattdessen ist bei 6,6 ppm ein singuläres Signal zu erkennen, welches in den Spektren von 8-MMK₆ und MK₆ nicht zu detektieren ist. Dieses Signal stammt vom Proton, welches sich anstelle der Methylgruppe am C-2 Atom des methylierten DMK₈ befindet. Da die Protonen der Kohlenstoffatome 5 – 7 dieselben Signale zeigen wie bei 8-MMK₆, deutet dies ebenfalls darauf hin, dass das Signal bei 6,6 ppm vom H-Atom am C-2 stammt.

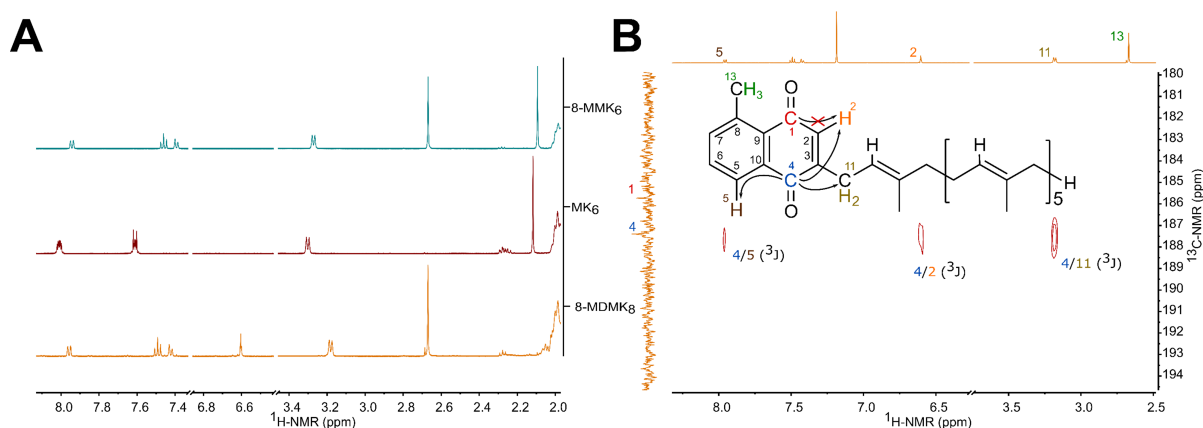


Abbildung 39 NMR-Analysen von 8-MDMK₈. (A), Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von 8-Methylmenachinon-6 (blau), Menachinon-6 (rot) und 8-Methyl-2-demethylmenachinon-8 (orange). (B), Relevanter Ausschnitt des ¹H,¹³C-HMBC-NMR Spektrums von 8-MDMK₈ zur Bestimmung der Position der Methylgruppe an der Chinonkopfgruppe. Gezeigt sind die vicinalen Kopplungen (³J) der Carbonyl-Kohlenstoffatome C-4 und C-1 zu den benachbarten Wasserstoffatomen. Die genauen Zuordnungen der Protonen sind im Anhang aufgelistet (Tab. 13).

Die Daten zur endgültigen Bestätigung der methylierten Position lieferte das ¹H,¹³C-HMBC-NMR Spektrum von 8-MDMK₈. Die entscheidenden Signale sind in Abbildung 39B dargestellt. Es sind die drei ³J-Kopplungen vom C-4 Kohlenstoffatom zu den Protonen an den C-Atomen C-5, C-11 und C-2 zu erkennen. Eine geminale Kopplung von C-1 zum Wasserstoffatom am C-2 Atom kann im ¹H,¹³C-HMBC-NMR nicht beobachtet werden. Da eine ³J-Kopplung von C-1 zum Wasserstoffatom am C-8 nicht detektiert wurde, jedoch die ³J-Kopplung von C-4 zum Wasserstoffatom am C-5 vorhanden war, bestätigen die Signale zusammen mit den ¹H-Spektren die Struktur der Chinonkopfgruppe von 8-MDMK₈.

8.3. Identifizierung der C-7-spezifischen Menachinon-Methyltransferase MenK2 von *Adlercreutzia equolifaciens*

Nach der Identifizierung der C-8 Menachinon-Methyltransferase MenK aus *A. equolifaciens*, stellte sich die Frage, wie dieses Bakterium 7,8-DMMK₆ produziert. In BLAST-Analysen von WsMqnK gegen das Genom von *A. equolifaciens* fiel auf, dass neben MenK ein weiteres zu WsMqnK homologes Protein im Genom von *A. equolifaciens* kodiert ist. Dieses Protein weist mit 62 % eine hohe Identität zu AeMenK auf und wurde daher AeMenK2 (Genlokus: Aeq1016) genannt (Abb. 40).

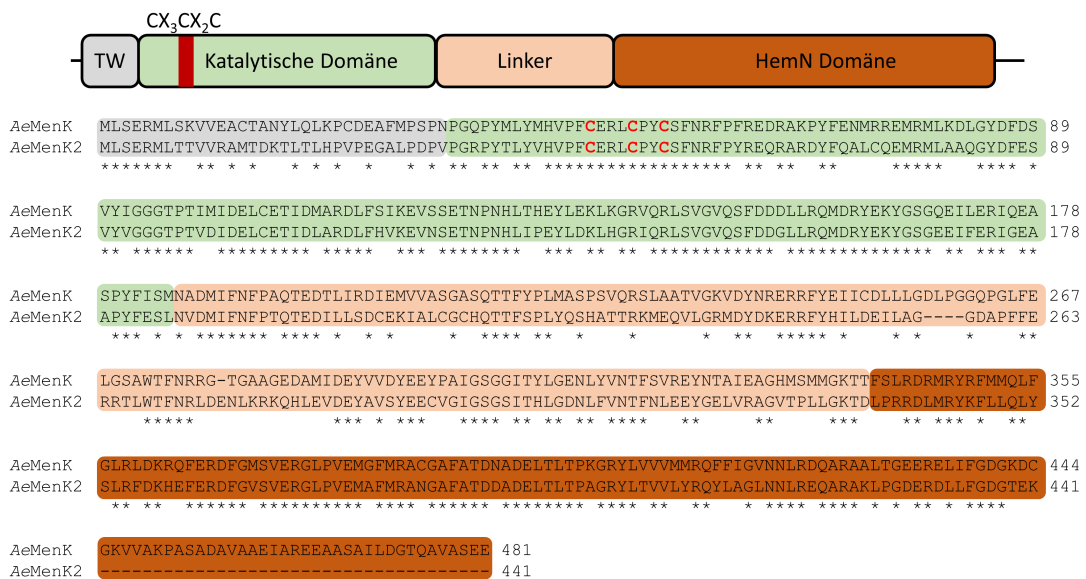


Abbildung 40 Primärstruktur-Sequenzvergleich und Domänenstruktur von MenK und MenK2 aus *A. equolifaciens* (62 % Identität). Die katalytische Domäne besitzt ein CxxxCxxC Motiv, welches essentiell ist, um das [4Fe-4S]-Zentrum zu ligandieren. Der Linker repräsentiert eine variable Region zwischen der HemN-Domäne und der katalytischen Domäne. Die HemN-Domäne, welche ihren Namen von der sauerstoffunabhängigen Coproprophyrinogen III-Dehydrogenase hat, ist wahrscheinlich wichtig für die Wechselwirkung mit der Membran und/oder die Substratspezifität. *; Identische Aminosäuren, TW; N-terminaler „Trip-wire“-Abschnitt. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt.

Zur Identifikation weiterer möglicher MenK2 Proteine wurden zunächst alle bisher beschriebenen DMMK-produzierenden Organismen untersucht. Auffällig dabei ist, dass alle acht identifizierten Bakterien aus der Klasse der Coriobacteriia stammen. Mithilfe von BLAST-Analysen wurden die MenK- und MenK2-Homologe in den vier Bakterien gesucht, dessen Genomsequenzen vorlagen (Tab. 10).

Tabelle 10 Zusammenstellung aller bekannten DMMK-produzierenden Bakterien.

Organismus	Beschriebene Chinone ¹	MenK Homolog ²	MenK2 Homolog ²	Referenz
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> DSM 19450	7,8-DMMK ₆ , 8-MMK ₆	BAN75994 (Aequ0025)	BAN76985 (Aequ1016)	Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Eggerthella lenta</i> JCM 9979 ^T	MMK ₆ , MK ₆ , DMMK ₆	WP_015759778	WP_015760735	Collins <i>et al.</i> , 1985; Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Eggerthella sinensis</i> JCM 14551 ^T	MMK ₆ , DMMK ₆ , MK ₆	Unbekannt ³	Unbekannt ³	Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Gordonibacter faecihominis</i> CAT-2	MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆	Unbekannt ³	Unbekannt ³	Jin <i>et al.</i> , 2014
<i>Gordonibacter pamelaiae</i> DSM 19378	MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆	CBL03906	Nicht Identifiziert	Jin <i>et al.</i> , 2014
<i>Enterorhabdus caecimuris</i> B7	MMK ₆ , DMMK ₆	EOS50322	EOS52476	Clavel <i>et al.</i> , 2009
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i> JCM 14552 ^T	MMK ₆ , DMMK ₆ , MK ₆	Unbekannt ³	Unbekannt ³	Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Parvibacter caecicola</i> NR06	DMMK ₆ , MMK ₆	Unbekannt ³	Unbekannt ³	Clavel <i>et al.</i> , 2013

¹ Das vorherrschende Naphthochinon ist als erstes genannt, sofern beschrieben.

² GenBank Accession-Nummer

³ Keine Genomsequenz verfügbar.

In drei der vier Fälle wurden jeweils ein MenK2- und ein MenK-Homolog identifiziert, allein der Organismus *Gordinobacter pamelaiae* DSM 19378 kodiert lediglich ein mögliches MenK-Homolog. Um einen besseren Überblick über die Korrelation von MenK und MenK2 zu bekommen, wurden mithilfe von BLAST-Analysen 166 HemN-ähnliche Proteine identifiziert, die in der Klasse der Coriobacteriia bekannt sind. Aus diesen Proteinen wurde eine phylogenetische Analyse mit MAFFT durchgeführt und ein Dendrogramm erstellt (Abb. 41). Dieser phylogenetische Baum spaltet sich in drei Kladen auf. Bei zwei der Kladen ist die genaue Funktion aller Proteine unbekannt, jedoch kommen hier auch Homologe von HemN und ChuW vor. Die dritte Klade beinhaltet nur Sequenzen von MenK2- und MenK-Proteinen. Der Baum sagt vorher, dass 18 Organismen sowohl ein MenK als auch ein MenK2 Protein besitzen.

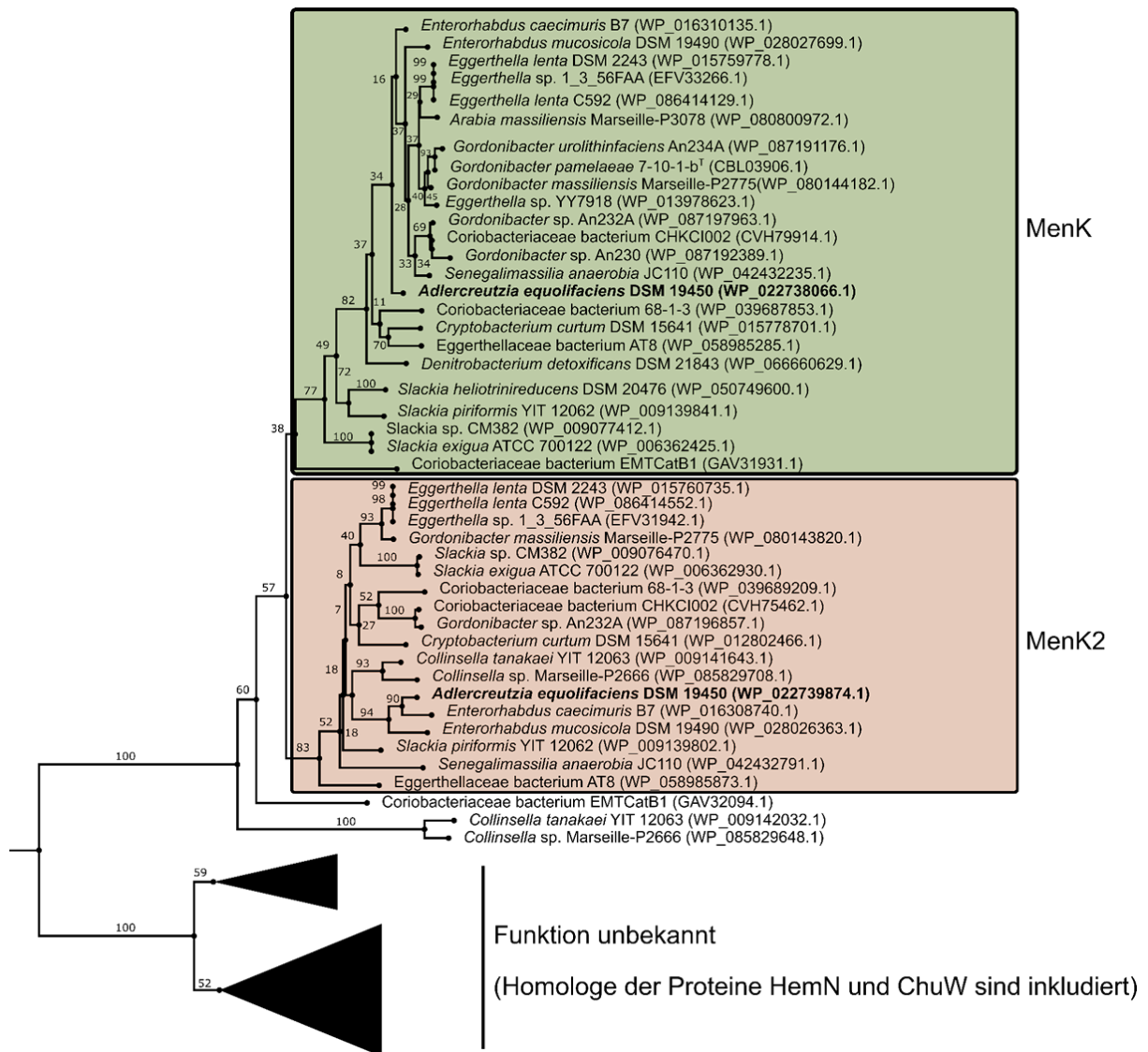


Abbildung 41 Phylogenetische Analyse von 166 HemN-ähnlichen Proteinen aus der Klasse der Coriobacteriia. Der phylogenetische Baum teilt sich in drei unterschiedliche Klade auf, nämlich in die MenK/MenK2-Klade und zwei Klade, die Homologe von HemN, der Anaerobin-Synthase ChuW und Proteine mit unbekannter Funktion enthalten. Das multiple Sequenzalignment (MSA) und das Dendrogramm wurde mit MAFFT und 500 Bootstrap-Wiederholungen erstellt.

Zur Überprüfung, ob es sich bei AeMenK2 um eine Menachinon-Methyltransferase mit einer Methylierungsspezifität für das C-Atom 7 handelt, wurde das Gen *menK2* mittels PCR aus dem Genom von *A. equolifaciens* amplifiziert und in den Vektor pReCovrD kloniert. Das resultierende Plasmid wurde genutzt, um *menK2* heterolog in der 8-MMK₆-defizienten Mutante *W. succinogenes* Δ *mqnK* zu produzieren. Nach der Erstellung des Stamms *W. succinogenes* Δ *mqnK* Rec_{for}-*menK2*, wurde dessen Chinonprofil mittels HPLC analysiert und mit dem des entsprechenden MenK-produzierenden Stammes verglichen (Abb. 42).

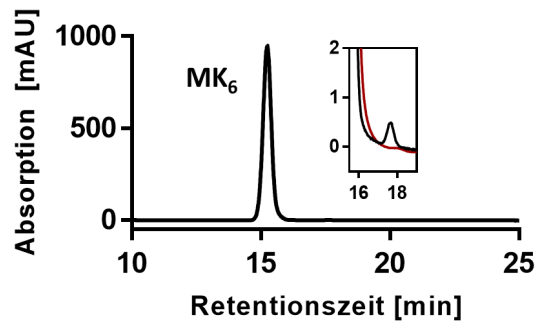


Abbildung 42 Vergleich der Chinonprofile von MenK- bzw. MenK2-produzierenden *W. succinogenes*-Zellen. (A), Chinonprofil von *W. succinogenes* $\Delta mqnK$ Rec_{for}-AemenK2. Einschub: Vergrößerung des Chinonprofils von A zwischen den Retentionszeiten von 15 und 19 min. Rot: Chinonprofil der Kontrolle *W. succinogenes* $\Delta mqnK$. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($n=3$).

Im Vergleich zur Mutante *W. succinogenes* $\Delta mqnK$ ist ein weiteres Signal mit einer RT von 17,8 min zu erkennen (Nebenbild von Abb. 42). Die Absorption von weniger als 1 mAU reichte jedoch nicht aus, um die entsprechende Substanz näher zu charakterisieren. Bereits in vergangenen Analysen wurde gezeigt, dass die Produktion des Proteins AeMenK in dem Stamm *W. succinogenes* $\Delta mqnK$ Rec_{for}-AemenK zu einer geringen Ausbeute von 8-MMK₆ führte (nicht gezeigt). Dies könnte an einer geringen Effizienz des pReCovrD-Expressionssystems liegen. Daher wurde ein weiteres Expressionssystem für *W. succinogenes* getestet. Aus dem Vektor pMK2, der ursprünglich für die heterologe Produktion von Multihäm-Cytochromen *c* entwickelt wurde, wurde die kodierende Sequenz für das NrfA-Signalpeptid mittels PCR entfernt und das *menK2* Gen (bzw. das *menK* Gen) mithilfe der CPEC-Technik in den Vektor eingebracht. Der entstandene Vektor wurde pMK2-AemenK2-Strep bzw. pMK2-AemenK-Strep genannt. Damit war es möglich, im Genom von *W. succinogenes* *napA::cat* das Gen der katalytischen Untereinheit der Nitritreduktase (*nrfA*) gegen das *menK2*- bzw. *menK*-Gen auszutauschen (Abb. 43).

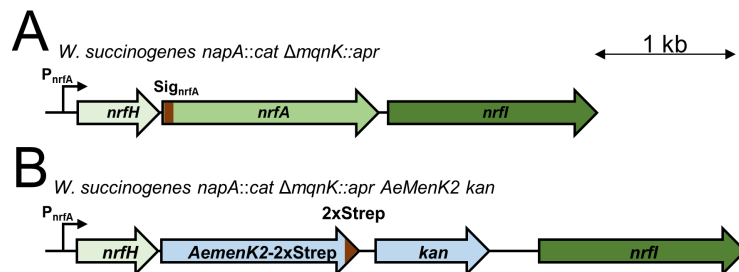


Abbildung 43 Der *nrf*-Lokus im Genom von *W. succinogenes* *napA::cat* $\Delta mqnK::apr$ (A) und *W. succinogenes* *napA::cat* $\Delta mqnK::apr$ AeMenK2 *kan* (B). Zur Produktion von AeMenK2 wurde das Gen der terminalen Reduktase NrfA gegen das AeMenK2 Gen und eine Kanamycinresistenzgenkassette (*kan*) ausgetauscht. Dem Gen *AemenK2* wurde zudem die Sequenz für einen Twin-Strep-Tag (2xStrep) angehängt. P_{nrfA}: Nativer *nrf*-Promotor, *nrfH*: Gen des Membranankers NrfH im Nitritreduktase-Komplex NrHfA, *nrfA*: Gen der Cytochrom *c*-Nitritreduktase NrfA, *nrfI*: Gen der NrfA-spezifischen Cytochrom *c*-Synthase Nrfl, *AemenK2*-2xStrep: Gen des Strep-getaggten MenK2 Proteins, 2xStrep: Twin-Strep-tag, Sig_{nrfA}: kodierende Sequenz für das NrfA Signalpeptid.

Als Expressionstamm wurde *W. succinogenes napA::cat* gewählt, da in diesem Stamm aus unbekannten Gründen das *nrf*-Gen Cluster in Formiat/Fumarat-Medium überexprimiert wird und damit eine erhöhte Expression des *menK2*- bzw. *menK*-Gens in Formiat/Fumarat-Medium erzielt wird. Als nächstes wurde im *W. succinogenes napA::cat* Stamm das *mqnK*-Gen mithilfe des zuvor erstellten Plasmids p Δ mqnK::apr deletiert. Der resultierende Stamm *W. succinogenes napA::cat Δ mqnK::apr* wurde anschließend mit dem Plasmid pMK2-AeMenK2 bzw. pMK2-AeMenK transformiert. Nach der Erstellung der Stämme *W. succinogenes napA::cat Δ mqnK::apr AeMenK2 kan* und *W. succinogenes napA::cat Δ mqnK::apr AeMenK kan* wurden beide Stämme in 100 ml Formiat/Fumarat-Medium kultiviert und auf ihre Chinonzusammensetzung untersucht. Das Chinonprofil von *W. succinogenes napA::cat Δ mqnK::apr AeMenK kan* zeigte im Vergleich zu dem des Stammes *W. succinogenes Δ mqnK::kan* Recfor-AemenK eine derart signifikante Steigerung der 8-MMK₆-Produktion, dass MK₆ mittels HPLC kaum nachweisbar war (Abb. 44A).

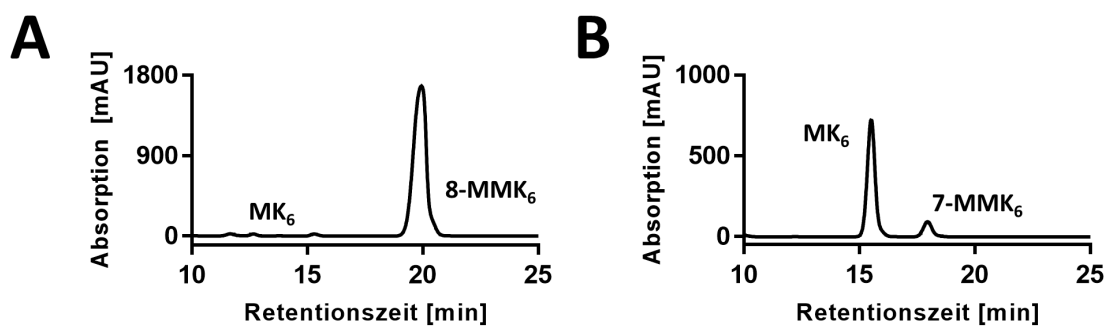


Abbildung 44 Vergleich der Chinonprofile von MenK- bzw. MenK2-produzierenden *W. succinogenes*-Zellen. (A), Chinonprofil von *W. succinogenes napA::cat Δ mqnK::apr AeMenK kan*. (B), Chinonprofil von *W. succinogenes napA::cat Δ mqnK::apr AeMenK2 kan*. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *W. succinogenes* spezifischen HPLC-Methode analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($n=3$).

Durch die Expression von *AemenK2* mit dem pMK-System konnte auch eine höhere Bildung des vermeintlichen 7-MMK₆ bei einer RT von 17,9 min erreicht werden (Abb. 44B). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob es in *W. succinogenes* möglich ist, mithilfe des Proteins AeMenK2 DMMK₆ zu produzieren. Daher wurde in den Stamm *W. succinogenes napA::cat* unter Verwendung des pMK2-AeMenK2 Vektors das *AemenK2* Gen eingeführt. Im Chinonprofil des resultierenden Stammes *W. succinogenes napA::cat AeMenK2 kan*, sind im Vergleich zur Parentalmutante (*W. succinogenes napA::cat*) neben MK₆ und 8-MMK₆ noch zwei weitere Substanzen zu erkennen (Abb. 45A und B).

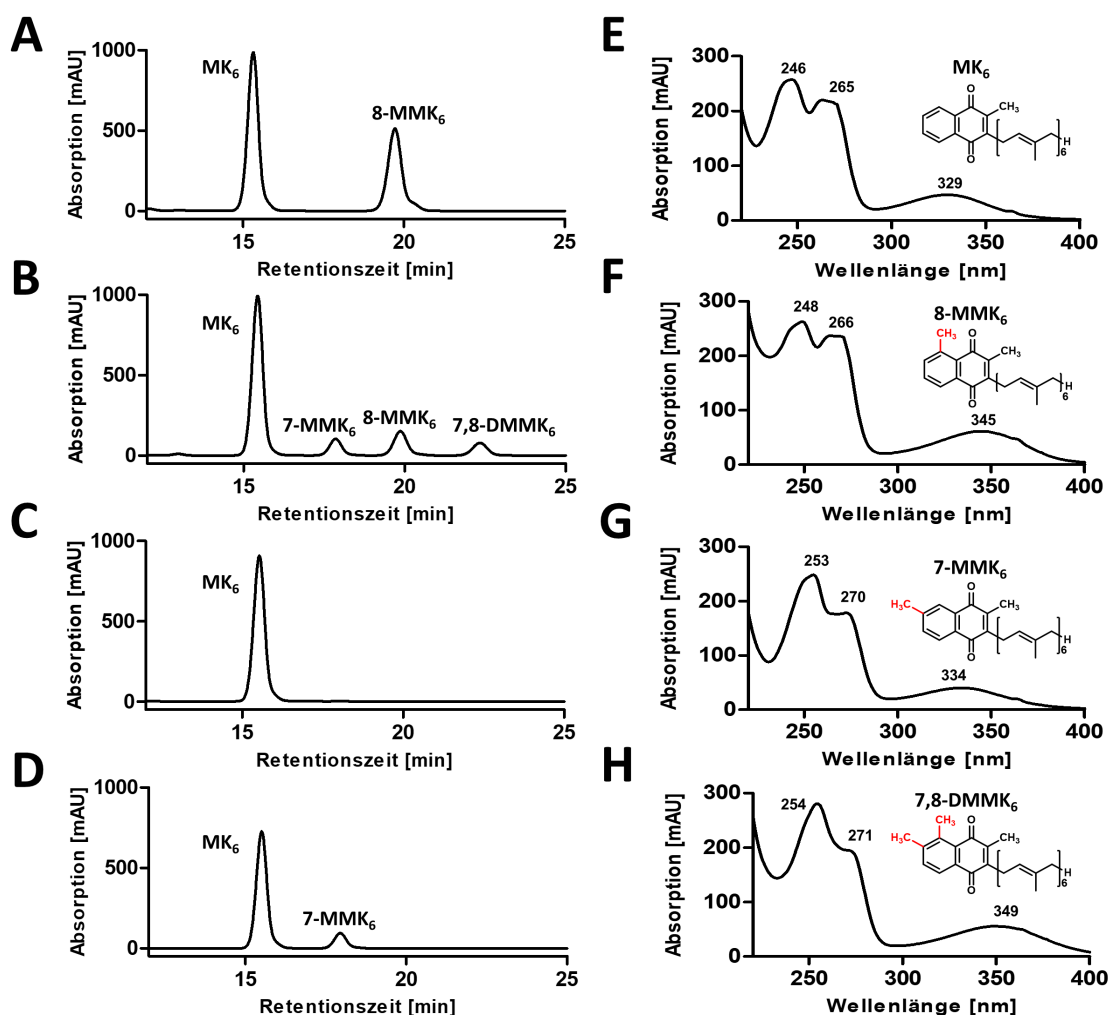


Abbildung 45 HPLC-Profil der Chinone aus verschiedenen *W. succinogenes* Mutanten. (A-D), HPLC Chromatogramme von Chinonen gereinigt aus *W. succinogenes* *napA::cat* (A); *W. succinogenes* *napA::cat* *AeMenK2 kan* (B); *W. succinogenes* *napA::cat* Δ *mqnK::apr* (C); *W. succinogenes* *napA::cat* *AeMenK2 kan* Δ *mqnK::apr* (D); (E-H), UV/VIS-Absorptionsspektren und die dazugehörigen Chinon-Strukturen. Die Chinone wurden aus dem Stamm *W. succinogenes* *napA::cat* *AeMenK2 kan* isoliert und mit der *W. succinogenes* spezifischen HPLC-Methode analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($n=3$). (E), Menachinon-6; (F), 8-Methylmenachinon-6; (G), 7-Methylmenachinon-6; (H), 7,8-Dimethylmenachinon-6.

Die UV/VIS Spektren der beiden zusätzlichen Chinone zeigen ähnliche Spektren wie die von MK₆ und 8-MMK₆. Es wurde daher vermutet, dass es sich hierbei um die Chinone 7-MMK₆ und 7,8-DMMK₆ handelt, was durch NMR-Studien bestätigt wurde (siehe Kap. 7). Das typische Menachinonspektrum besitzt zwischen 200 nm und 400 nm drei Maxima bei 246 nm, 265 nm und 329 nm. Durch die Methylierung an Position 8 verschiebt sich das langwelligste Maximum um 16 nm auf 345 nm, während sich die beiden kurzwelligen Maxima nicht wesentlich verändern (Abb. 45E und F). Im Vergleich dazu erkennt man in den beiden UV/VIS Spektren von 7-MMK₆ und 7,8-DMMK₆ zwei Maxima und ein Plateau (Abb. 45G und H). Im Falle von 7-MMK₆ befinden sich die Maxima bei 253 nm und 334 nm. Dies entspricht einem Unterschied zu den jeweiligen Maxima von MK₆ von 7 bzw. 5 nm. Das zweite Maximum von MK₆ ist beim

7-MMK₆ nicht zu finden. Stattdessen befindet sich hier ein Plateau bei 270 nm. Mit der Abweichung von 1 nm für das Maximum bei 253 nm und dem Plateau zeigt das Spektrum von 7,8-DMMK₆ in diesem Bereich starke Ähnlichkeiten zum Spektrum von 7-MMK₆. Das langwellige Maximum ist, vergleichbar mit dem von 8-MMK₆, um 20 nm verschoben und spricht daher für eine Methylierung an Position C-8.

8.4. Charakterisierung von AeMenK2 und AeMenK2-AeMenK-Chimären in *E. coli*

Nach der erfolgreichen Produktion von AeMenK2 und dem Nachweis von 7,8-DMMK₆ und 7-MMK₆ in *W. succinogenes* wurde das *AemenK2*-Gen in den IPTG-induzierbaren pACYC-Duet-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Nach der Induktion der Expression und Produktion des Strep-getaggten AeMenK2-Proteins wurde das Chinonprofil von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 analysiert und mit dem von *E. coli* BL21(DE3) verglichen (Abb. 46). Im Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3) zeigte der Chinonextrakt von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 ein zusätzliches Signal mit einer RT von 14,2 min. Die entsprechende Substanz zeigte ein identisches UV/VIS-Spektrum mit dem von 7-MMK₆ aus *W. succinogenes* *napA::cat* AeMenK2 *kan* und wurde somit als 7-MMK₈ identifiziert.

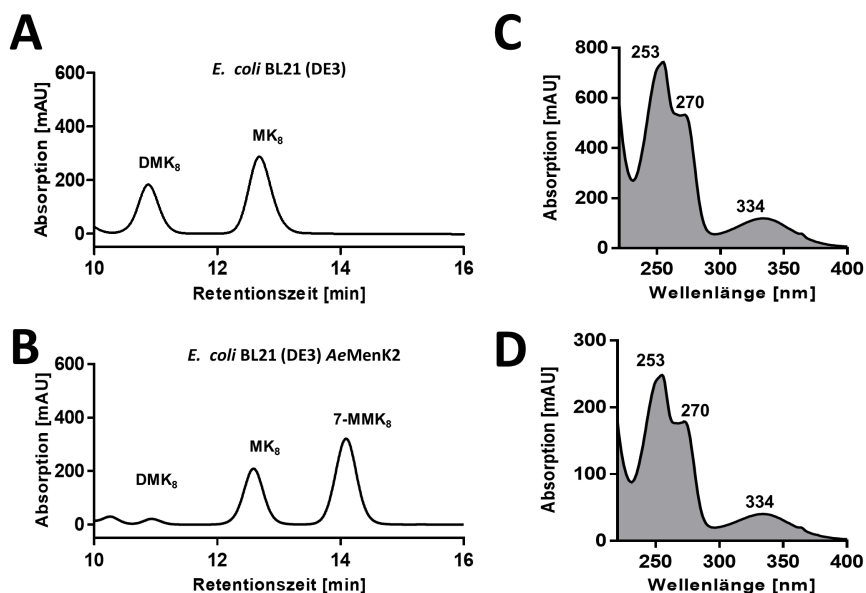


Abbildung 46 Chinonprofile von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2. (A), Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der *E. coli* BL21(DE3) Zellen. (B), Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der induzierten *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 Zellen. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *E. coli* spezifischen HPLC-Methode analysiert. DMK₈, 2-Demethylmenachinon-8; MK₈, Menachinon-8; 7-MMK₈, 7-Methylmenachinon-8. (C), UV-Vis Spektrum des Analyten mit der Retentionszeit von 17,9 min (7-MMK₆) des Chinonprofils aus Abb. 45D. (D), UV-Vis Spektrum des Analyten mit der Retentionszeit von 14,2 min (7-MMK₈) des Chinonprofils aus (B).

Um den Aminosäurebereich von AeMenK2 einzugrenzen, der für die positionsspezifische Methylierung des Menachinonrings ausschlaggebend ist, wurden chimäre Proteine mit Anteilen von AeMenK sowie AeMenK2 erstellt. Als Grundgerüst für das Design der Chimären wurde AeMenK2 genutzt. Methodisch wurde das pAC-AeMenK2 Plasmid mit den in Tabelle 17 aufgelisteten Primern ohne den auszutauschenden Bereich amplifiziert. Parallel wurde vom Plasmid pAe-MenK-Strep der jeweilige auszutauschende Bereich mit den Primern aus Tabelle 17 amplifiziert. Beide Fragmente wurden anschließend mittels der CPEC-Methode zusammengefügt. Maßgeblich für das Design war das in Abbildung 47 gezeigte Homologiemodell von AeMenK2. Beim chimären Protein Chim-1 wurde ein Teil des Linkers (Aminosäurereste 218-293 von MenK2) gegen den entsprechenden Abschnitt von AeMenK ausgetauscht. Es wurde nur der mittlere Teil des Linkers verwendet, da im Homologiemodell der N-terminale Teil des Linkers noch zur TIM-Barrel Struktur vom MenK2 gehört und ein Austausch die Struktur womöglich hätte destabilisieren können (Abb. 47).

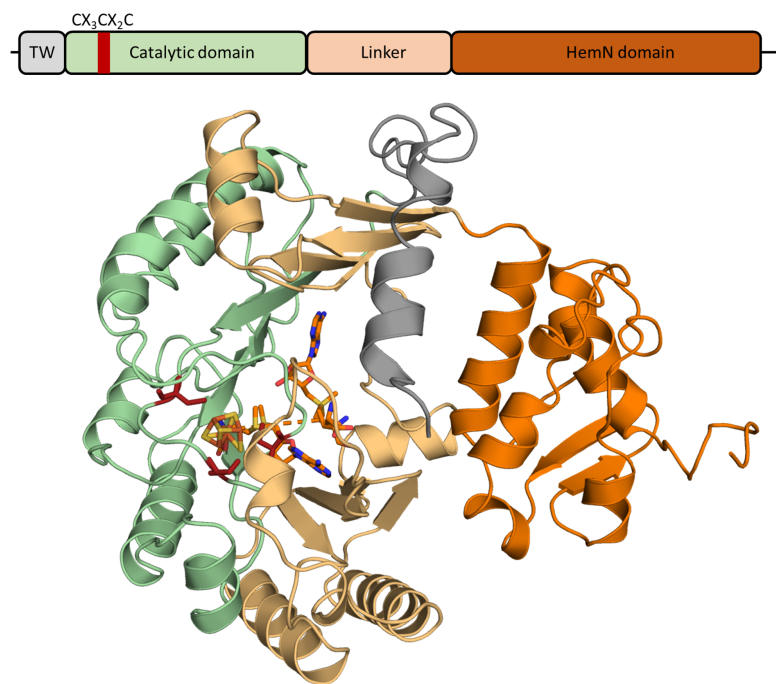


Abbildung 47 Homologiemodell von MenK2 aus *A. equifaciens*. (A), TW (Grau): N-terminaler Trip-wire. Grün: Katalytische Domäne; Hellorange: Linker; Orange: HemN-Domäne. Das Modell wurde mit iTASSER (Zhang *et al.*, 2008) erstellt.

Die gesamte HemN-Domäne (335-441) von AeMenK2 wurde beim Protein Chim-2 gegen die von AeMenK getauscht, und bei Chim-3 wurde zusätzlich zur HemN Domäne auch der Linker ausgetauscht. Die in *E. coli* BL21 (DE3) produzierten Chimäre wurden mittels Westernblot nachgewiesen und die Chinonprofile der *E. coli*-Stämme mittels HPLC analysiert (Abb. 48).

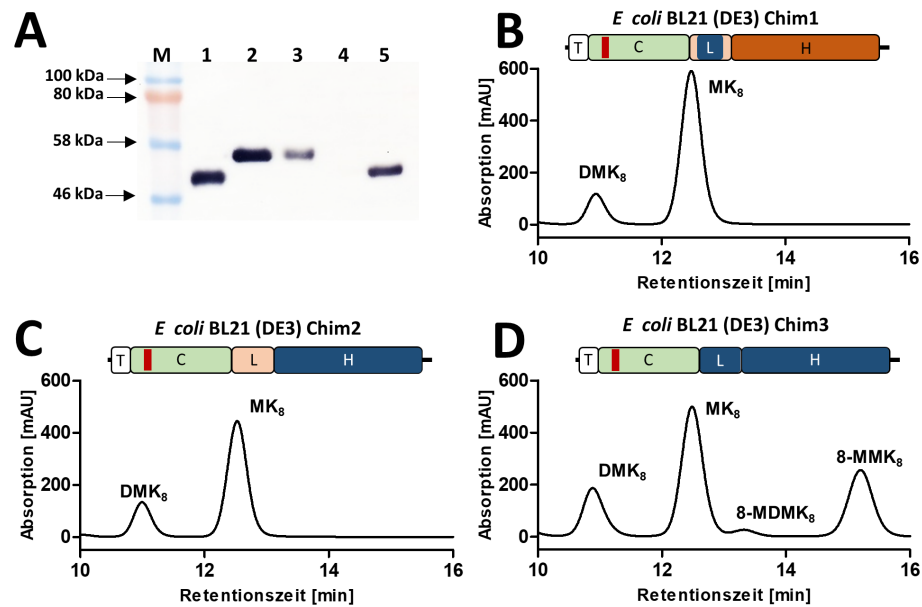


Abbildung 48 Charakterisierung von verschiedenen *E. coli* BL21(DE3) Stämmen, welche MenK2 bzw. eine MenK/MenK2-Chimäre (Chim1, Chim2 oder Chim3) produzieren. (A), Immunodetektion von Strep-getaggttem MenK2 bzw. von MenK/MenK2-Chimären. 50 µg Gesamtzellprotein wurden mittels SDS-PAGE und eines 12,5 %igen SDS-Gels getrennt. Nach dem Transfer auf PDVF-Membran wurden die Strep-getaggtten Proteine durch ELISA mit dem Strep-Tactin-HRP-Konjugat (IBA GmbH) detektiert. M, Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB); Spur 1, *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 (berechnete Masse: 51,9 kDa) (Abb. 46A); Spur 2, *E. coli* BL21(DE3) Chim2 (55,6 kDa); Spur 3, *E. coli* BL21(DE3) Chim3 (55,3 kDa); Spur 4, *E. coli* BL21(DE3) (Abb. 46A); Spur 5, *E. coli* BL21(DE3) Chim1 (51,4 kDa). (B-D), Repräsentative HPLC-Chromatogramme der induzierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Die blauen Bereiche in der Domänenstruktur der MenK/MenK2-Chimären zeigen die eingebrachten MenK-Regionen. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *E. coli*-spezifischen HPLC-Methode analysiert. DMK₈, 2-Demethylmenachinon-8; MK₈, Menachinon-8; 7-MMK₈, 7-Methylmenachinon-8; 8-MMK₈, 8-Methylmenachinon-8; 8-MDMK₈, 8-Methyl-2-Demethylmenachinon-8.

Die Produktion der Chimären Chim-1 und Chim-2 konnte im Westernblot nachgewiesen werden, jedoch wurde das Chinonprofil von *E. coli* durch die Proteine im Vergleich zu dem von *E. coli* BL21 (DE3) nicht verändert. Im Chinonprofil von *E. coli* BL21(DE3) Chim-3 sind nach der Produktion der Chimäre 8-MMK₈ und 8-MDMK₈ nachzuweisen. Das Chinonprofil ist vergleichbar mit dem von *E. coli* BW25113 pAe-MenK-Strep (Abb. 36C). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ortsspezifität der Methylierung in MenK- bzw. MenK2-Proteinen durch den Bereich des Linkers und der HemN-Domäne verursacht wird.

8.5. Methylierung von DMK durch AeMenK2

AeMenK ist in der Lage MK und DMK zu methylieren. In den Chinonprofilen von AeMenK2-produzierenden *E. coli*-Zellen (Abb. 46B) war jedoch nur das an C-7 methylierte MK₈ in den Chromatogrammen zu erkennen. Die entsprechende methylierte Form von DMK, das 7-MDMK₈, wurde dagegen nicht identifiziert. Da 7-MMK₈ eine um 1,1 min kürzere Retentionszeit besitzt als 8-MMK₈, bestand die Vermutung, dass 7-MDMK₈ ebenfalls um ca. 1,1 min schneller eluiert als 8-MDMK₈ (RT: 13,2 min). Damit hätte das 7-MDMK₈ eine Retentionszeit von ca. 12,2 min und würde damit ähnlich wie MK₈ (RT: 12,5 min) eluieren. Bei hohen Konzentrationen an MK₈ in den Zellen würde somit 7-MDMK₈ von diesem überlagert und könnte nicht in den Chromatogrammen detektiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde das Protein AeMenK2 erneut in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Um so viel MK₈ wie möglich zu methylieren wurden die Zellen für 36 h statt 16 h bei 30 °C inkubiert. Die Verteilung der Chinone wurde anschließend mit dem Chinonprofil von Zellen verglichen, die nur 16 h bei 30 °C inkubiert worden waren (Abb. 49).

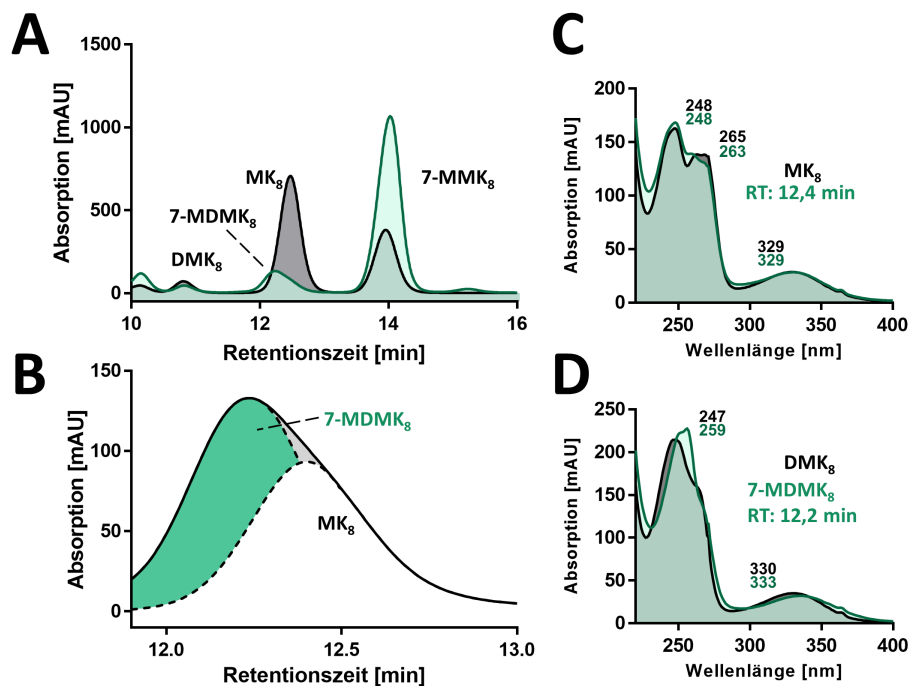


Abbildung 49 Vergleich des Chinonprofils von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 nach 16 h und 36 h Kultivierung bei 30 °C. (A), HPLC-Chromatogramm der Chinonextrakte von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2. Grün: 36 h bei 30 °C inkubiert; schwarz: 16 h bei 30 °C inkubiert. (B), Vergrößerter Ausschnitt des Chinonprofils von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 nach 36-stündiger Inkubation. Durchgezogene Linie: HPLC-Chromatogramm, gepunktet: Hypothetische Absorptionen (grün: 7-MDMK₈; weiß: MK₈). (C), Vergleich der UV-VIS-Spektren von MK₈ (schwarz) aus *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 nach 16 h (Abb. 46B) und *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 nach 36 h bei der RT von 12,4 min (grün). (D), Vergleich der UV-VIS-Spektren von DMK₈ (RT: 11,9; schwarz) und dem potentiellen 7-MDMK₈ aus dem Chromatogramm von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 nach 36 h bei der RT von 12,2 min (grün). Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *E. coli*-spezifischen HPLC-Methode analysiert.

Die Absorptionsmaxima beider Chromatogramme sind, bis auf die Absorption zwischen einer RT von 12 min und 13 min, identisch (Abb. 49A). Diese Absorption wird im Chromatogramm von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 (16 h) durch MK₈ verursacht. Im Chromatogramm von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 (36 h) ist eine Verringerung der Retentionszeit des Absorptionsmaximums um 0,2 min zu erkennen. Zudem weist das Signal bei 12,2 min keine Symmetrie wie die anderen Signale des Chromatogramms auf (Abb. 49B). Die Dekonvolution in Abb. 49B legt nahe, dass es vermutlich zwei absorbierende Verbindungen sind, nämlich MK₈ bei einer RT von 12,4 min und das potentielle 7-MDMK₈ bei einer RT von 12,2 min. Durch den Vergleich der UV/VIS-Spektren von MK₈ und dem Spektrum des Eluats bei einer RT von 12,4 min im Chromatogramm von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 (16 h) sind zwei der drei typischen Maxima von MK₈ zu erkennen (Abb. Abb. 49C). Das dritte Maximum bei 265 nm ist deformiert, was wahrscheinlich auf eine Kontamination mit 7-MDMK₈ zurückzuführen ist. Das UV-VIS Spektrum des Eluats bei einer RT von 12,2 min im Chromatogramm von *E. coli* BL21(DE3) AeMenK2 (36 h) unterscheidet sich hier deutlich von dem des MK₈ und des Eluats bei einer RT von 12,4 min (Abb. 49D). Es zeigt eher Ähnlichkeiten mit dem Spektrum von DMK₈. Im Vergleich zu DMK₈ sind die beiden Maxima bei 247 nm und 330 nm um 9 nm bzw. 6 nm auf 256 nm und 336 nm verschoben. Die charakteristische Schulter von DMK₈ ist fast vollständig verschwunden. Ähnliche kleine Verschiebungen der Maxima sowie die Abflachung der Absorption bei 265 nm waren bereits bei der C-7 Methylierung von MK₈ aufgefallen (Abb. 46D). Diese Indizien stützen die Annahme, dass es sich bei der Substanz mit einer RT von 12,2 min um 7-MDMK₈ handelt. Zur finalen Bestätigung müsste dieses Experiment jedoch wiederholt werden und das potentielle 7-MDMK₈ im Milligramm Maßstab isoliert werden, um eine Strukturaufklärung mittels NMR durchführen zu können. Eine Analyse der exakten Masse würde hier nicht ausreichen, da dieselbe Masse wie von MK₈ erwartet wird.

8.6. Diskussion

8.6.1. Charakterisierung von C-8-Menachinon-Methyltransferasen

Neben den Deletions- und Komplementationsexperimenten, die das Genprodukt des *mqnK*-Gens als Menachinon-Methyltransferase identifizierten, wurde das Protein in *E. coli* produziert und die *in vivo* Funktion des Proteins bestimmt. Dies bestätigt die These, dass MqnK eine Menachinon-Methyltransferase ist. Alle in der Literatur bekannten MMK-produzierenden Mikroorganismen wurden in Tabelle 14 (Anhang) mit ihrem jeweiligen Menachinon-Methyltransferase-Gen (*mqnK* oder *menK*) aufgeführt. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Organismen *S. oneidensis* und *A. equolifaciens* den klassischen Menachinon Biosyntheseweg nutzen und nicht wie *W. succinogenes* den Futasin-Biosyntheseweg (Dairi, 2012; Hein *et al.*, 2017a). Nach der Produktion der Proteine SoMenK und AeMenK in *E. coli* wurde durch Analyse in den Chinonextrakten das erwartete 8-MMK₈ und die C-8 methylierte Form von 2-Demethylmenachinon nachgewiesen. Das 8-MDMK₈ wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, da die Organismen, die in der Lage sind, 8-MMK oder 7,8-DMMK zu produzieren (mit Ausnahme von *Aeropyrum pernix* K1), offenbar kein DMK in nachweisbaren Mengen bildeten. *E. coli* besitzt von Natur aus neben Menachinon-8 und Ubichinon-8 auch signifikante Mengen an DMK₈ und nutzt dieses auch in diversen respiratorischen Atmungsketten (Wissenbach *et al.*, 1990). DMK₈ besitzt im Gegensatz zu MK₈ keine Methylgruppe am Kohlenstoffatom C-2 und zeigt daher möglicherweise eine geringere sterische Hinderung als MK₈ bei der durch das Enzym MenK katalysierten Reaktion. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit von Demethylmenachinon und Menachinon ist eine Promiskuitivität des Enzyms MenK in diesem Fall durchaus denkbar.

8.6.2. Identifizierung und heterologe Produktion der C-7-Menachinon-Methyltransferase aus *Adlercreutzia equolifaciens*

Durch bioinformatische Analysen wurden in dem 7,8-DMMK₆-produzierenden Bakterium *A. equolifaciens* neben AeMenK mit einer Identität von 62 % eine weitere mögliche Menachinon-Methyltransferase identifiziert. Die *in vivo* Charakterisierung von AeMenK2 erfolgte zunächst mittels des pReCovrD-Systems und führte nur zu einer geringen Bildung einer weiteren Substanz im HPLC-Chromatogramm. Diese Beobachtung wurde zuvor auch bei der Charakterisierung von AeMenK gemacht. In der Masterthesis von Markus Polly (2015) wurde das AeMenK ebenfalls mittels des pReCovrD-Systems charakterisiert und führte nur zu einer geringen Produktion von 8-MMK₆. Durch die Verwendung des pMK2-Systems konnte die Bildung von 8-MMK₆ durch AeMenK so gesteigert werden, dass kaum noch MK₆ nachweisbar

war (Abb. 44A). Daher wurde dieses System auch zur Charakterisierung von AeMenK2 verwendet. Es war dadurch möglich, das bisher unbekannte Chinon in *W. succinogenes* *napA::cat ΔmqnK::apr AeMenK2* kan in signifikanten Mengen zu produzieren, welches sich durch NMR-Analysen als 7-Methylmenachinon-6 herausstellte (Kap. 7). Durch das Einbringen des AeMenK2-kodierenden Gens in den Stamm in *W. succinogenes* *napA::cat* konnte zudem die Bildung von 7,8-DMMK₆ nachgewiesen werden (Abb. 45). Durch die Chinonanalyse dieser Stämme, die Reinigung und die Strukturaufklärung der Chinone wurde bestätigt, dass AeMenK2 eine C-7 spezifische Menachinon-Methyltransferase ist. Die einzelnen Chinone zeigten zudem ein einzigartiges UV-VIS Spektrum, sodass eine eindeutige Unterscheidung dieser mittels UV-VIS Spektroskopie möglich war (Abb. 45).

8.6.3. Ursachen für die positionsspezifische Methylierung von Menachinon-Derivaten

Zum besseren Verständnis der Methylierung durch die Menachinon-Methyltransferasen wurden chimäre Proteine von AeMenK und AeMenK2 erstellt. Ziel war es diejenige(n) Region(en) des Proteins zu identifizieren, die verantwortlich für die Position der Methylierung ist/sind. Dafür wurde zunächst die Aktivität des AeMenK2 Proteins in *E. coli in vivo* bestätigt (Abb. 46). Anschließend konnte durch die Chimäre Chim-3 gezeigt werden, dass die Kombination aus Linker-Bereich und HemN-Domäne ausschlaggebend für die Position der Methylierung am Menachinon sind. Der Austausch eines Teils des Linkers oder der gesamten HemN-Domäne führte zu einem methylierungsinaktiven Protein (Abb. 48). Da vermutlich eine Interaktion des Linkers mit der HemN-Domäne stattfindet, dürfte in den entsprechenden chimären Proteinen diese Interaktion nicht richtig ausgeführt werden, was zu einer falschen Faltung des Proteins führen könnte. Durch multiple Sequenzalignments von MenK- und MenK2-Proteinen wurde innerhalb des ausgetauschten Bereichs von Chim-3 das gemeinsame Motiv QTTFXPLX identifiziert (Abb. 50).

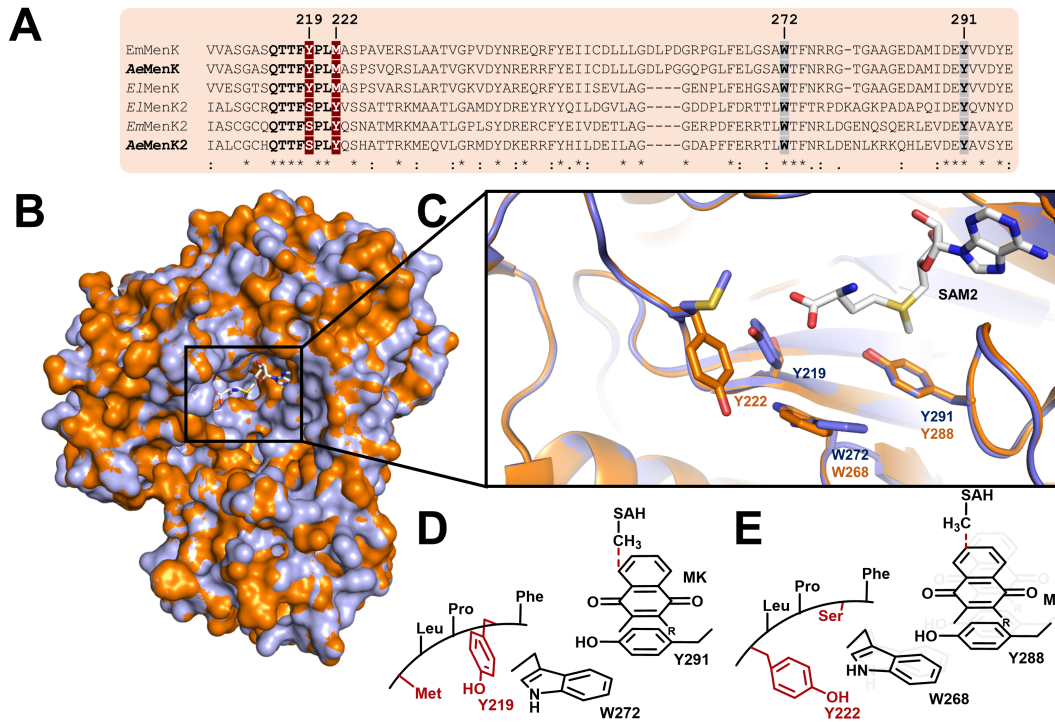


Abbildung 50 Modell der Substratspezifität. (A), Ausschnitt des multiplen Sequenzalignments der Linker-Domäne von MenK und MenK2 Proteinen. Die Nummerierung entspricht der des AeMenK Proteins. *, Konservierte Aminosäuren. :, Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. (B), Homologie-Modell von AeMenK (blau) und AeMenK2 (orange). (C), Ausschnitt des Homologie-Modells von B. Gezeigt ist das mögliche aktive Zentrum der Proteine AeMenK und AeMenK2 sowie das zweite SAM-Molekül. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Das Modell wurde mit iTASSER (Zhang *et al.*, 2008) erstellt. (D), Hypothetische Bindestelle des Menachinons im aktiven Zentrum des Proteins AeMenK. In Rot dargestellt, sind die zu AeMenK2 unterschiedlichen Aminosäuren. (E), Hypothetische Bindestelle des Menachinons im aktiven Zentrum des Proteins AeMenK2. In Grau gezeigt sind die potentiellen Positionen von W272 und Y288 des AeMenK Proteins. In Rot dargestellt, sind die zu AeMenK unterschiedlichen Aminosäuren.

In den jeweiligen Proteinen aus *A. equolifaciens* sind die beiden mit X bezeichneten Stellen ebenfalls konserviert. So besitzen MenK2-Proteine das Motiv QTTFSPPLY und MenK-Proteine das Motiv QTTFYPLM. Dieses Motiv befindet sich nahe der Bindestelle des zweiten SAM Moleküls, das die Methylgruppe auf Menachinon transferiert und könnte eine mögliche Erklärung für die Spezifität geben. Zudem sind in direkter Nähe dieses Motivs die strikt konservierten aromatischen Aminosäuren W272 (Nummerierung gemäß AeMenK) und Y291 zu finden (Abb. 50 B-C). In dem berechneten Homologie Modell der Proteine AeMenK und AeMenK2 befindet sich Tyrosin 291 direkt unterhalb der Methylgruppe des zweiten SAMs. Es wäre denkbar, dass dieser Tyrosinrest mithilfe von π - π -Wechselwirkungen für die Bindung des Menachinons zuständig ist. Der Tyrosinrest könnte wiederum durch das Tryptophan 272 in Position gebracht werden, welches wiederum vom Tyrosin 219 positioniert wird. Im AeMenK2-Modell befindet sich an der Position 219 kein Tyrosin, sondern ein Serin, jedoch ist an Position 222 ein Tyrosin zu finden. Dieser positionelle Unterschied könnte das

Tryptophan 268 in eine andere Position bringen als W272 in AeMenK, wodurch sich die Konformation des Tyrosins ändert und das Kohlenstoffatom C-7 des Menachinons in die kritische Nähe zum zweiten SAM positioniert werden könnte. Erste Indizien für die Bedeutung dieser Aminosäuren bei der Katalyse der Methylierung konnte Markus Polly (2015) in seiner Masterarbeit zeigen. Er tauschte das jeweilige Pendant der Aminosäuren W272 und Y219 des AeMenK Proteins im Enzym WsMqnK gegen Alanin aus und zeigte *in vivo*, dass die Bildung von 8-MMK₆ durch die resultierenden Proteinvarianten im Vergleich zu WsMqnK in *W. succinogenes* um etwa die Hälfte sinkt. Ein zweites Indiz ergab der Austausch des Motivs FSPLY von AeMenK2 gegen FYPLM von AeMenK (nicht gezeigt). Das resultierende Protein AeMenK2-S219Y/Y222M konnte erfolgreich produziert werden, zeigte aber keine *in vivo* Aktivität. Dies könnte zum einen daran liegen, dass weitere bisher nicht bekannte Aminosäuren ebenfalls an der Positionierung des Chinons beteiligt sind oder dass insbesondere der Austausch des Serins 219 durch ein Tyrosin das Protein aufgrund der Größe des Aminosäurerestes destabilisiert, wodurch es sich nicht richtig falten kann. Das Motiv FYPLM von AeMenK wurde nicht zum Motiv FSPLY mutiert, was aber in Zukunft als Kontrolle noch durchgeführt werden kann. Zudem sollte die Aminosäure Y288 in AeMenK2 bzw. Y291 in AeMenK gegen Alanin oder Leucin ausgetauscht werden, um einen möglichen Einfluss auf die Menachinon-Bindung bzw. –Methylierung zu analysieren.

Für die Erstellung der Homologie-Modelle von AeMenK und AeMenK2 wurde die Kristallstruktur der Coproporphyrinogen III Oxidase (HemN; PDB: 1OLT) genutzt, da dieses Protein aufgrund der HemN-Domäne und der radikalischen SAM-Domäne die größte Übereinstimmung zu AeMenK/AeMenK2 besitzt (Layer *et al.*, 2005). HemN katalysiert die Bildung der Vinyl-Gruppen im Häm-Molekül indem es zwei der vier Karbonsäure-Gruppen im Coproporphyrinogen III über einen radikalischen Mechanismus oxidiert. Im Vergleich des hier diskutierten Bereichs zu der Sequenz von HemN fällt auf, dass nur das Tyrosin 291 von AeMenK ebenfalls in HemN konserviert ist. Sofern dieser Rest an der Bindung des Substrats beteiligt ist, ist die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen mit den Coproporphyrinogen III denkbar.

9. Funktion von MMK und Regulation des MMK-Gehalts

9.1. Regulation des 8-MMK₆-Gehalts in *W. succinogenes*

Die Regulation der Produktion unterschiedlicher Chinonspezies stellt in Mikroorganismen eine Stellschraube zur Anpassung an unterschiedliche Lebensbedingungen dar. So wurde gezeigt, dass *E. coli* den Menachinon-Gehalt hochreguliert und den Gehalt an Ubichinon in der Membran herunterreguliert, sobald das Umfeld anaerob wird (Unden & Bongaerts, 1997). Für *W. succinogenes* wurde bereits 2002 von Dietrich & Klimmek (2002) gezeigt, dass der Gehalt an 8-MMK₆ in der Membran nach der Kultivierung mit Nitrat als Elektronenakzeptor signifikant sank. Zur näheren Untersuchung wurden hier Zellen von *W. succinogenes* *nosZ*⁺ zunächst mit den stickstoffhaltigen Elektronenakzeptoren Nitrat und Distickstoffmonoxid (N₂O, Lachgas) kultiviert. Dieser Stamm wurde ausgewählt, da er ein intaktes *nosZ* Gen besitzt, das die N₂O-Reduktase kodiert. Im Genom des Wildtypstammes DSM 1740 wird dieses Gen durch ein Insertionselement unterbrochen, wodurch die Zellen nicht in der Lage sind, Distickstoffmonoxid als Elektronenakzeptor zu nutzen (Simon *et al.*, 2004). Die Chinonprofile der Zellen wurden analysiert und mit dem Profil von *W. succinogenes* *nosZ*⁺-Zellen verglichen, die mit Fumarat als Elektronenakzeptor kultiviert worden waren (Abb. 51).

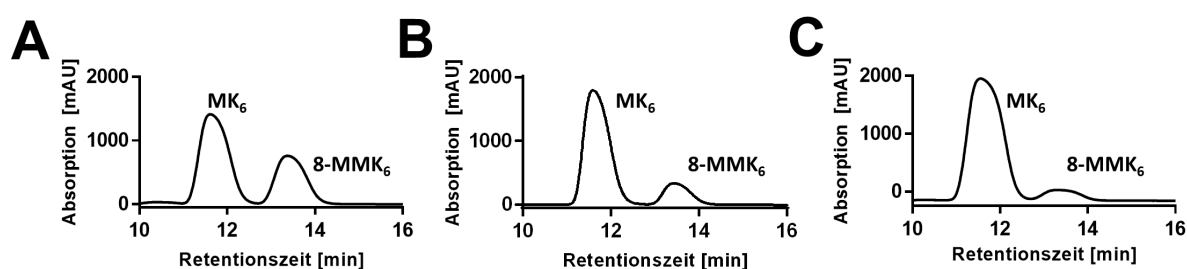


Abbildung 51 Chinonprofile von *W. succinogenes* *nosZ*⁺ Zellen, welche mit 90 mM Formiat als Elektronendonator und mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren kultiviert wurden. (A), Als Elektronenakzeptor diente 100 mM Fumarat. (B), Als Elektronenakzeptor diente eine reine N₂O-Atmosphäre. Zusätzlich enthielt das Medium 5 mM Fumarat, das als Kohlenstoffquelle fungierte. (C), Als Elektronenakzeptor diente 50 mM Nitrat. Das Medium enthielt außerdem 5 mM Fumarat. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm (*n*=3). Die Chinonextrakte wurden mit der allgemeinen Chinon-HPLC Methode analysiert (Kap. 6.5.2).

Sowohl in Nitrat- als auch in N₂O-vermehrten Zellen sank der Anteil von 8-MMK₆ in der Membran der Zellen im Vergleich zu der mit Fumarat als Elektronenakzeptor gewachsenen Kultur. Die jeweiligen Anteile von MK₆ und 8-MMK₆ sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Anteile von MK₆ und 8-MMK₆ in der Membran von *W. succinogenes* Wildstamm- und Mutanten-Zellen.

Stamm/Mutante	Terminaler Elektronenakzeptor / [C-Quelle ¹]	MK ₆ [%]	8-MMK ₆ [%]
Wildstamm	Fumarat (90 mM)	63	37
<i>nosZ</i> ⁺	Fumarat (90 mM) (Abb. 51A)	68	32
<i>nosZ</i> ⁺	N ₂ O / [Fumarat] (Abb. 51B)	85	15
<i>nosZ</i> ⁺	N ₂ O / [Succinat]	98	2
<i>nosZ</i> ⁺	Nitrat (50 mM) / [Fumarat] (Abb. 51C)	88	12
<i>nosZ</i> ⁺	Nitrat (50 mM) / [Succinat]	88	12

¹ 5 mM Natriumfumarat oder 5 mM Natriumsuccinat wurden als Kohlenstoffquelle hinzugegeben.

Wurde Succinat als Kohlenstoffquelle anstelle von Fumarat verwendet, sank der prozentuale Anteil von 8-MMK₆ in den mit Lachgas kultivierten Zellen auf 2 %. Im Gegensatz dazu verblieb die Konzentration von 8-MMK₆ mit Nitrat als Elektronenakzeptor und Succinat als C-Quelle bei 12 %. Der Einfluss von Nitrat auf den 8-MMK₆ Anteil in *W. succinogenes* wurde im Weiteren charakterisiert. Die Kultivierung von *W. succinogenes nosZ*⁺ fand in Formiat/Fumarat Medium statt, dem unterschiedliche Endkonzentrationen an Nitrat hinzugesetzt wurden (Abb. 52).

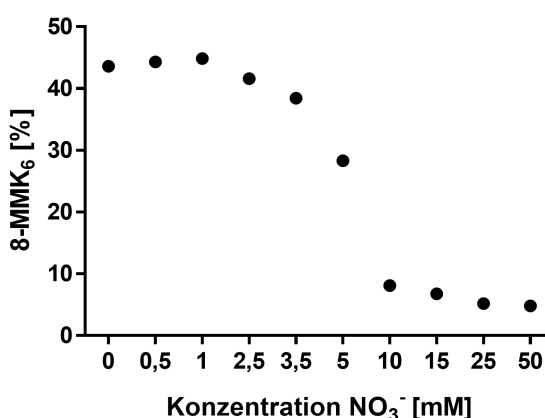


Abbildung 52 Einfluss von Nitrat auf den Anteil von 8-MMK₆ im Chinonpool. Zellen von *W. succinogenes nosZ*⁺ wurden in 90 mM Formiat/100 mM Fumarat-Medium in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Nitrat für 16 h kultiviert. Nach der Kultivierung besaßen alle Kulturen vergleichbare OD_{578nm}-Werte zwischen 0,85 und 0,90 (*r*=3). Anschließend wurden die Chinone isoliert und mittels der HPLC Methode für *W. succinogenes* analysiert (Kap. 6.5.2).

Es ist zu erkennen, dass der Anteil von 8-MMK₆ bis zu einer Konzentration von 1 mM Nitrat im Medium konstant bei ca. 45 % liegt. Anschließend sinkt der 8-MMK₆-Anteil mit zunehmender Nitrat-Konzentration bis 15 mM und ab 15 mM Nitrat stagniert er bei einem Anteil von ca. 4-8 % 8-MMK₆. Nachdem gezeigt wurde, dass der Gehalt an 8-MMK₆ mit steigender Nitratkonzentrationen sinkt, wurde die zeitliche Veränderung des Chinonpools bezogen auf die Nitrat-Respiration untersucht (Abb. 53). Dafür wurde eine mit Formiat/Fumarat-Medium vermehrte Vorkultur von *W. succinogenes nosZ*⁺ in 2 L Formiat/Nitrat Medium kultiviert. Stündlich wurden sowohl die OD_{578nm} als auch der Chinongehalt bestimmt (Abb. 53).

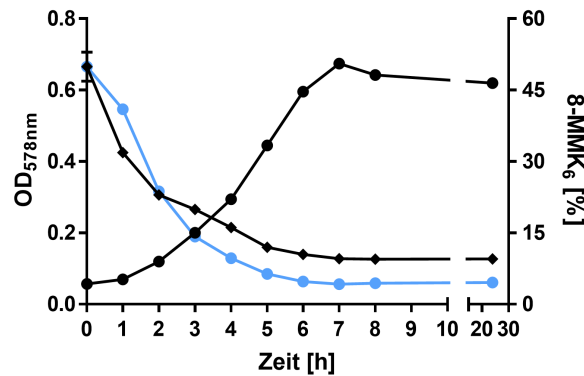


Abbildung 53 Zeitliche Veränderung des 8-MMK₆-Anteils im Chinonprofil von *W. succinogenes nosZ*⁺-Zellen während des Wachstums mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. Die Wachstumskurve (Schwarz; Kreis) wurde in 2 L 100 mM Formiat/50 mM Nitrat Medium durchgeführt. Als Vorkultur diente eine in Formiat/Fumarat gewachsene *W. succinogenes nosZ*⁺ Kultur. Für die Chinonextraktion wurden zu jeder vollen Stunde 100 ml Medium entnommen. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der für *W. succinogenes* spezifischen HPLC-Methode analysiert (Kap. 6.5.2). Die dargestellten Daten wurden aus drei biologischen Replikaten ($n=3$) ermittelt und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Schwarze Vierecke: 8-MMK₆ Konzentration in %; Blaue Kreise: Theoretischer 8-MMK₆-Gehalt unter der Annahme, dass während des Wachstums kein 8-MMK₆ gebildet oder abgebaut wird.

Die zeitliche Analyse des Chinonpools zeigt, dass die größte Änderung des 8-MMK₆ Anteils in den ersten 2 Stunden stattfindet. Innerhalb dieser Zeit sinkt der Anteil von 8-MMK₆ in der Kultur von etwa 50 % auf 20 % 8-MMK₆. Nach 7 Stunden Kultivierung befinden sich im Chinonpool nur noch 9,6 % 8-MMK₆, was einer Erniedrigung des Ausgangsgehalts um 81 % entspricht. Dabei wurde zu jedem Zeitpunkt im Mittel ein Gesamtchinon-Gehalt von $4,0 \pm 0,5 \mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{OD}_{578\text{nm}})$ gemessen. Dies spricht für einen konstanten Chinongehalt. Geht man davon aus, dass während der Kultivierung von *W. succinogenes nosZ*⁺ mit Nitrat als Elektronenakzeptor die Biosynthese von 8-Methylmenachinon-6 vollständig unterdrückt und das bereits vorhandene 8-MMK₆ nicht abgebaut würde, würde das 8-MMK₆ mit jeder Verdopplung der Zellen verdünnt. Bei einem konstanten Chinongehalt ergibt sich unter diesen Annahmen die in Abb. 53 dargestellte blaue Kurve. Dabei ist im Vergleich zur gemessenen 8-MMK₆ Konzentration zu erkennen, dass nach der ersten Stunde die Konzentration an 8-MMK₆ schneller gesunken ist als das Modell annimmt, jedoch ab Stunde 3 die Konzentration an 8-MMK₆ stets um etwa 5 % höher ist als die modellierte Konzentration. Zudem ist zu beobachten, dass das Modell mit den gemessenen Daten in einem linearen Zusammenhang steht (Pearson Korrelationskoeffizient: 0,974).

9.2. Einfluss von 8-MMK₆ auf die Elektronentransportaktivität der Sulfid-Respiration von *W. succinogenes*

Neben den Chinonananalysen des Stammes *W. succinogenes nosZ⁺*, wurde der *W. succinogenes* Stamm *mccR⁺ cat* genutzt, um den Gehalt von 8-MMK₆ während der Respiration mit Sulfid zu untersuchen (Eller *et al.*, 2019). Der Stamm *W. succinogenes mccR⁺ cat* wurde ausgewählt, da im Genom des Wildtypstammes DSM 1740 das Gen des Transkriptionsaktivators MccR des Sulfid-Reduktase-Operons (*mcc*) einen inaktivierenden Frameshift aufweist. Die Bildung der aktiven Sulfid-Reduktase MccA fand im Wildstamm erst nach über 12 h Kultivierung mit Sulfid statt und nachdem das Fumarat aus dem Medium verbraucht war (Kern *et al.*, 2011). *W. succinogenes mccR⁺ cat* besitzt dagegen ein intaktes *mccR* und eignet sich daher besonders für die Untersuchung der Sulfid-Respiration in *W. succinogenes*. Die Chinonanalyse von *W. succinogenes mccR⁺ cat*-Zellen, die mit Sulfid als alleinigem Elektronenakzeptor kultiviert wurden, zeigt im Vergleich zu Zellen, die mit Fumarat oder einem Gemisch aus 45 mM Fumarat und 10 mM Sulfid kultiviert wurden, einen um ca. 10 % niedrigeren 8-MMK₆ Gehalt (Tab. 12).

Tabelle 12 Verteilung von MK₆ und 8-MMK₆ in der Membran von *W. succinogenes mccR⁺ cat*.

Mutante	Terminaler Elektronenakzeptor / [C-Quelle ¹]	MK ₆ [%]	8-MMK ₆ [%]
<i>mccR⁺ cat</i>	Fumarat (45 mM)	47	53
<i>mccR⁺ cat</i>	Fumarat (45 mM); Sulfid (10 mM)	44	56
<i>mccR⁺ cat</i>	Sulfid (10 mM) / [Fumarat]	53	47
<i>mccR⁺ cat</i>	Sulfid (10 mM) / [Succinat]	54	46

¹ 5 mM Natriumfumarat oder 5 mM Natriumsuccinat wurden als Kohlenstoffquelle hinzugegeben.

Da der 8-MMK₆-Gehalt während der Sulfid-Respiration nicht wie bei der Nitrat- oder N₂O-Respiration um über 75 Prozent sinkt, besteht die Annahme, dass 8-MMK₆ für die Respiration mit Sulfid benötigt wird. Um dies zu untersuchen, wurde im Stamm *W. succinogenes mccR⁺* das Gen *mqnK* deletiert. Die Deletion wurde mittels PCR bestätigt und der Phänotyp wurde durch Häm-Färbung und Chinonanalyse untersucht (Abb. 54). Die Häm-Färbung zeigte, dass die Stämme *W. succinogenes mccR⁺* und *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK* in der Lage sind, unter Anwesenheit von Sulfid die Sulfidreduktase MccA zu produzieren. Die Chinonanalyse ergab, dass der Stamm *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK* im Vergleich zum *W. succinogenes mccR⁺* kein 8-MMK₆ in der Membran mehr enthielt (Abb. 54C und D).

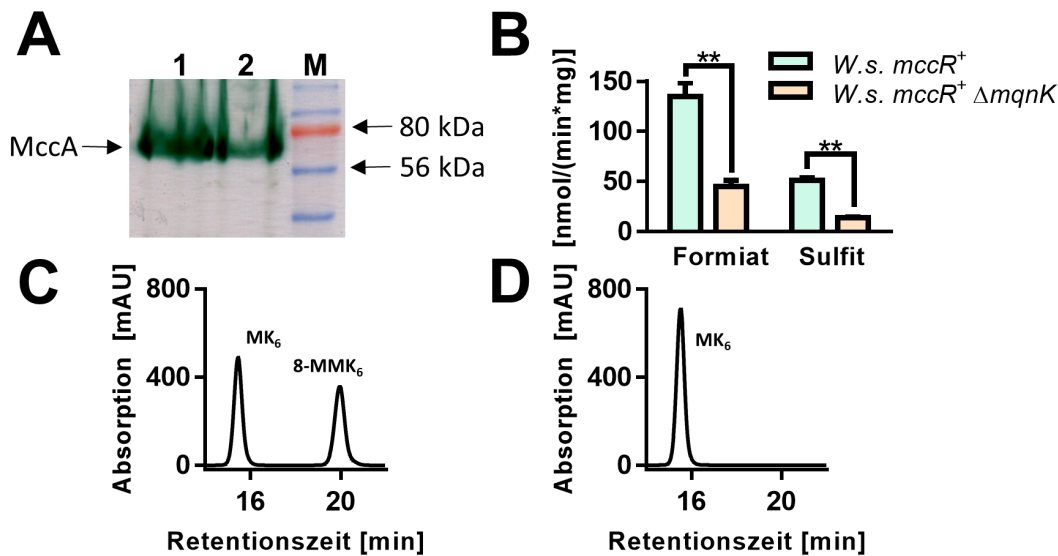


Abbildung 54 Abhängigkeit der Sulfitatmung von 8-MMK₆ in *W. succinogenes*. (A), Nachweis von MccA durch Häm-Färbung. Je 100 µg Gesamtzellprotein wurden mittels eines 12,5 %igen SDS-Gels aufgetrennt. Spur 1: *W. succinogenes* *mccR*⁺; Spur 2: *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mqnK*. (B), Bestimmung der Elektronentransportaktivität, ermittelt durch den Verbrauch von Formiat bzw. Sulfit durch Zellen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ und *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mqnK*. Die Zellen wurden in 100 ml Formiat/Fumarat/Sulfit-Medium bis zur spät-exponentiellen Phase kultiviert. Die Kulturen wurden zentrifugiert und in 10 ml 50 mM Tris Puffer pH 8,0 resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 1:5-, 1:10- und 1:20-Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurden 100 mM Formiat sowie 10 mM Sulfit zu den Verdünnungen gegeben und diese bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, wobei alle 10 min eine Probe entnommen wurde. Die dargestellten Daten wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (t-Test: ** p = 0,0005). (C), Chinonprofil von *W. succinogenes* *mccR*⁺. (D), Chinonprofil von *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mqnK*. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *W. succinogenes* spezifischen HPLC-Methode analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives HPLC Chromatogramm (n=3).

Der Einfluss von 8-MMK₆ auf die Sulfitatmung von *W. succinogenes* wurde durch die Bestimmung der Elektronentransportaktivität ermittelt. Nach Ermittlung der Sulfit- und Formiatkonzentrationen wurden deren Umsatzraten berechnet (Abb. 54B). Das Verhältnis von verbrauchtem Formiat zu umgesetztem Sulfit liegt in beiden Stämmen bei ca. 3:1 und stimmt mit dem Elektronentransportmodell von Kern *et al.* (2011) überein.

Es fällt jedoch auf, dass nach der Deletion von *mqnK* die Umsatzraten von Formiat und Sulfit um durchschnittlich 77 % verringert wurden. Dieses Ergebnis deutet auf einen signifikanten Einfluss von 8-MMK₆ auf die Sulfitatmung hin.

9.3. Regulation des MMK₇-Gehalts in *S. oneidensis*

Neben den Chinonanalysen in *W. succinogenes* wurden auch in *Shewanella oneidensis* MR-1 die Chinonprofile nach dem Wachstum mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren verglichen (Abb. 55).

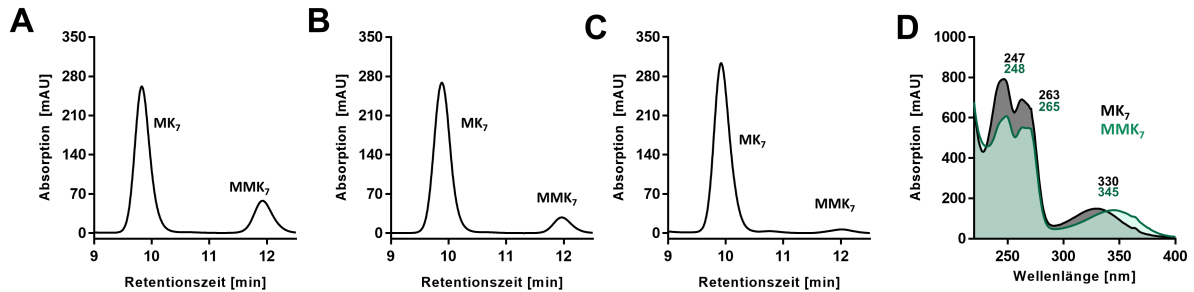


Abbildung 55 Chinonprofile von *S. oneidensis* MR-1 Zellen, welche mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren kultiviert wurden. (A), Als Elektronenakzeptor diente Fumarat (100 mM). (B), Als Elektronenakzeptor diente der Luftsauerstoff. (C), Als Elektronenakzeptor diente 25 mM Nitrat. (D), UV-Vis Spektren der Analyten mit den Retentionszeiten 9,8 min (MK₇) und 12 min (MMK₇). Die Verschiebung des langwelligigen Maximums um ca. 15 nm ist analog zu der der Chinone MK₆ und 8-MMK₆ aus Abb. 45. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ($n=3$). Die Chinonextrakte wurden mit der für *Shewanella* spezifischen HPLC Methode analysiert (Kap. 6.5.2).

In den gemessenen Chinonprofilen konnte anhand der UV-Vis-Spektren das MK₇ mit einer Retentionzeit von 9,8 min und das methylierte MMK₇ mit einer Retentionzeit von 12 min identifiziert werden (Abb. 55D). In Wachstumsexperimenten mit *S. oneidensis* MR-1 in M4-Medium (siehe Kap. 6.2.4) konnte ebenfalls beobachtet werden, dass der Anteil von Methylmenachinon im Chinonpool nach der Kultivierung mit Fumarat als Elektronenakzeptor am höchsten ist (23,5 %) (Abb. 56). Die beiden anderen für *S. oneidensis* typischen Elektronenakzeptoren Sauerstoff und Nitrat inhibieren scheinbar die Bildung von MMK₇, sodass im Falle von Nitrat nur noch 2,8 % 8-MMK₇ und von Sauerstoff nur noch 11,2 % MMK₇ in Membranen von Zellen der stationären Phase zu finden sind.

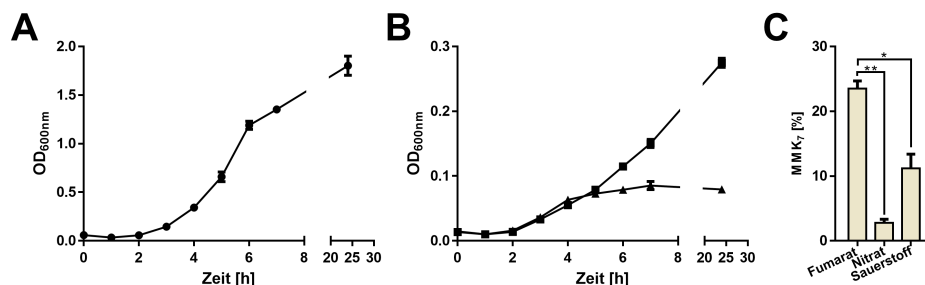


Abbildung 56 Wachstum von *S. oneidensis* MR-1 mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren und prozentualer Anteil von MMK in der Membran. (A), Wachstum von *S. oneidensis* MR-1 mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. (B), Wachstum von *S. oneidensis* MR-1 mit 20 mM Fumarat (Vierecke) und 2 mM Nitrat (Dreiecke) als terminalen Elektronenakzeptor. (C), Prozentualer Anteil von MMK₇ im Chinonprofil von *S. oneidensis* MR-1 nach Kultivierung mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren. Die Chinone wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und mit der *S. oneidensis* spezifischen HPLC-Methode analysiert (Kap. 6.5.2). Die dargestellten Daten wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (t-Test: * = $p < 0,005$; ** $p = 0,0005$).

9.4. Diskussion

9.4.1. Regulation des 8-MMK₆ Gehalts in *W. succinogenes*

Zur Untersuchung der Funktion von 8-MMK₆ in *W. succinogenes* wurden zunächst die Chinonprofile von *W. succinogenes*-Zellen nach Kultivierung mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren verglichen. Die in Abbildung 51 und Tabelle 11 dargestellten Daten zeigen deutlich die Erniedrigung des Gehalts an 8-MMK₆ in der Membran der *W. succinogenes* Zellen bei Präsenz der stickstoffhaltigen Elektronenakzeptoren Nitrat und Distickstoffmonoxid. Dieser reprimierende Effekt von Nitrat auf die Produktion von 8-MMK₆ in *W. succinogenes* wurde bereits 2002 beschrieben (Dietrich & Klimmek, 2002). Der konzentrationsabhängige Einfluss von Nitrat auf diesen Effekt konnte erstmals in Abbildung 52 gezeigt werden. Der Grund für die Abnahme des 8-MMK₆-Anteils ist nicht bekannt. In der Arbeit von Eller *et al.* 2019 wurde die mögliche Präsenz einer 8-MMK₆-Demethylase diskutiert. Für ein besseres Verständnis des 8-MMK₆ Abbaus wurde in Abbildung 53 die Abnahme von 8-MMK₆ bei einer mit Formiat/Nitrat wachsenden Kultur verfolgt, deren Vorkultur mit Formiat/Fumarat Medium vermehrt wurde. In diesem Medium besitzen die *W. succinogenes* Zellen einen Chinongehalt von ca. 65 % MK₆ und 35 % 8-MMK₆ (Tab. 11). Durch den Vergleich der Wachstumskurve mit dem 8-MMK₆ Gehalt konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil des 8-MMK₆ antiproportional zum Wachstum der Zellen verhält. Dieses Ergebnis spricht nicht für eine Demethylase. Der Verlauf deutet vielmehr auf eine Verdünnung des 8-MMK₆ mit dem Wachstum der Zellen hin. Möglicherweise wird die Produktion von MqnK durch Nitrat unterdrückt und das kontinuierlich produzierte MK₆ nicht mehr methyliert. Zur Unterstützung dieser These, wäre es hilfreich die Transkription des Gens *mqnK* oder die Menge an gebildetem MqnK in *W. succinogenes*-Zellen zu quantifizieren, die mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren kultiviert worden sind.

Neben *W. succinogenes* wurde *S. oneidensis* ebenfalls mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren kultiviert und der Chinongehalt der Kulturen verglichen. Hier konnte eine Erniedrigung des 8-MMK₇ Gehalts mit Nitrat als Elektronenakzeptor gemessen werden. Zudem wurde *S. oneidensis* mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor kultiviert. Chinonanaysen dieser Zellen zeigten ebenfalls eine Erniedrigung des 8-MMK₇ Gehalts im Vergleich zu Kulturen, welche mit Fumarat als Elektronakzeptor kultiviert wurden. Diese Repression der 8-MMK₇ Bildung in Gegenwart von Sauerstoff wurde bereits von Myers *et al.* (1993) beobachtet. Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist bisher unbekannt.

9.4.2. Bedeutung von 8-MMK₆ in *W. succinogenes*

In Kapitel 7 konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von MK₆ zu MMK₆ das Redoxpotential des Chinons um ca. 70 mV herabsetzt. Diese Erniedrigung des Redoxpotentials kann für einige respiratorische Atmungsketten essentiell sein. So rekonstituierten Dietrich und Klimmek (2002) die formiatabhängige Polysulfid-Respiration von *W. succinogenes* in Lipsomen, indem sie den Formiat-Dehydrogenase-Komplex FdhABC und den Polysulfid-Reduktase-Komplex PsrABC von *W. succinogenes* isolierten und in Lipsomen einbauten. Durch die Einbettung verschiedener Chinone in die Lipsomen wurde gezeigt, dass die Polysulfid-Respiration von *W. succinogenes* eine Abhängigkeit von 8-MMK₆ zeigte. Dietrich und Klimmek (2002) schlussfolgerten, dass das MKH₂ mit einem Standardredoxpotential von MK/MKH₂ ($E_0' = -70$ mV) im Vergleich zum Standardredoxpotential von Polysulfid/Hydrogensulfid ($E_0' = -275$ mV) zu positiv ist, um von der Chinol-Dehydrogenase PsrC oxidiert zu werden und die Elektronen auf Polysulfid zu übertragen. Daher wäre reduziertes 8-MMK₆ mit seinem negativeren Standardredoxpotential der geeignete Elektronendonator für PsrC (Dietrich & Klimmek, 2002). Der hypothetische Membrananker der Sulfitrespiration ist das MccD (Kern *et al.*, 2011; Eller *et al.*, 2019). Dieses zeigt durch seine vorhergesagten 8 Transmembranhelices und durch konservierte Aminosäuren starke Ähnlichkeiten zu PsrC auf und fungiert daher vermutlich als Chinol-Dehydrogenase. Auch das um 46 mV negativere Standardredoxpotential von Sulfid/Hydrogensulfid im Vergleich zu dem von MK/MKH₂ zeigt eine Parallele zur Polysulfidrespiration auf. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Sulfid-Respiration von *W. succinogenes* ebenfalls von 8-MMK₆ abhängig sein könnte. Da es bis auf die Sulfid-Reduktase MccA nicht gelang, die an der Sulfidrespiration beteiligten Proteine zu isolieren, konnte das Liposomen-Experiment von Klimmek und Dietrich nicht mit der Sulfidatmung von *W. succinogenes* nachgestellt werden. Abbildung 54B zeigt ein Experiment in dem mittels spät exponentiell gewachsener Kulturen der Stämme *W. succinogenes* *mccR*⁺ und *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mqnK* die Elektronentransportaktivität von Formiat zu Sulfid ermittelt wurde. Die Daten zeigen, dass pro mol Sulfid 3 mol Formiat verbraucht werden und bestätigen damit die Stöchiometrie der Reaktionsgleichung der Sulfid-Atmung mit Formiat (Kern *et al.*, 2011, Hermann *et al.*, 2015; Eller *et al.*, 2019). Des Weiteren konnte eine um 77 % geringere Elektronentransportaktivität der 8-MMK₆-defizienten Mutante *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mqnK* im Vergleich zu *W. succinogenes* *mccR*⁺ ermittelt werden. Die verbliebenen 27 % der Elektronentransportaktivität zeigten jedoch, dass prinzipiell beide Chinone von *W. succinogenes* für die Sulfidrespiration genutzt werden können. Durch das negativere Redoxpotential von 8-MMK₆ wäre es denkbar, dass die Oxidation von reduziertem 8-MMK₆ durch MccD energetisch gesehen vorteilhafter ist als die Oxidation von reduziertem

MK₆ durch MccD. Dies hätte zur Folge, dass die Elektronentransportaktivität mit 8-MMK₆ höher ist als mit MK₆. Der Vergleich aller Organismen, die ein mögliches *mcc*-Gencluster im Genom tragen, zeigt, dass bis auf einige Spezies der Gattungen *Edwardsiella* und *Anaeromyxobacter* alle Organismen eine putative Menachinon-Methyltransferase kodieren (Tabelle 20). Dies deutet hin auf eine Korrelation zwischen der Eigenschaft 8-MMK₆ zu produzieren und der Möglichkeit mit Sulfid als terminalem Elektronenakzeptor zu wachsen. Beim Vergleich von Chinonprofilen der *W. succinogenes* Stämmen, die mit unterschiedlichen terminalen Elektronenakzeptoren kultiviert wurden, ist zu erkennen, dass der Anteil von 8-MMK₆ in den Zellen, die mit Sulfid kultiviert waren, nicht signifikant sank im Vergleich zu Fumarat-gezogenen Zellen. Dagegen sank der Anteil von 8-MMK₆ in Kulturen, die mit N₂O oder Nitrat als Elektronenakzeptor kultiviert waren unter 15 %. Da davon ausgegangen wird, dass in den Elektronentransportwegen der N₂O- oder Nitratrespiration 8-MMK₆ nicht genutzt wird, ist diese Regulation durchaus nachzuvollziehen. Aus diesen Ergebnissen wurde das in Abbildung 57 gezeigte Modell aufgestellt.

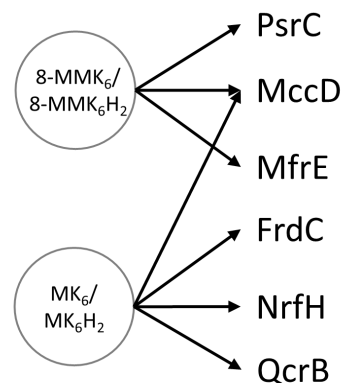


Abbildung 57 Modell der Chinonspezifität der charakterisierten Chinon-Dehydrogenasen von *W. succinogenes*.

Die Chinol-Dehydrogenase QcrB des Rieske/Cytochrom *bc*-Komplexes von *W. succinogenes*, der chinonreaktive Membrananker NrfH des Cytochrom *c* Nitrit-Reduktase-Komplexes NrfHA und die membranständige Untereinheit der Fumarat-Reduktase (FrdC) sind nach dem Modell Menachinon-reaktiv (Hein *et al.*, 2017b). Für den Membrananker der Polysulfid-Reduktase (PsrC) sowie die membranständige Untereinheit der Methylmenachinon-abhängigen Fumarat-Reduktase (MfrE) konnte gezeigt werden, dass diese Methylmenachinon-reaktiv sind (Dietrich & Klimmek, 2002; Juhnke *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde Membrananker MccD diesem Modell hinzugefügt, welcher sowohl MMK- als auch MK-reaktiv zu sein scheint.

10. Biochemische Charakterisierung der Menachinon-Methyltransferasen

10.1. *In vitro* Nachweis der Methyltransferaseaktivität von MBP-AeMenK

Zur Bestätigung, dass es sich bei MenK um eine Menachinon-Methyltransferase handelt, wurden *in vitro* Experimente mit dem isolierten Protein durchgeführt. Dafür wurde das Gen *AemenK* in den Vektor pMal-c2X kloniert und in *E. coli* XL-1 Blue eingebracht. In dem resultierenden Stamm *E. coli* XL-1 Blue pMBP-Ae-MenK wurde das AeMenK Protein produziert und anschließend mithilfe der Maltose-Bindeprotein-Affinitätschromatographie unter anoxischen Bedingungen gereinigt (Kap. 6.4.11). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels eines 12,5 %igen SDS-PA-Gels analysiert (Abb. 58).

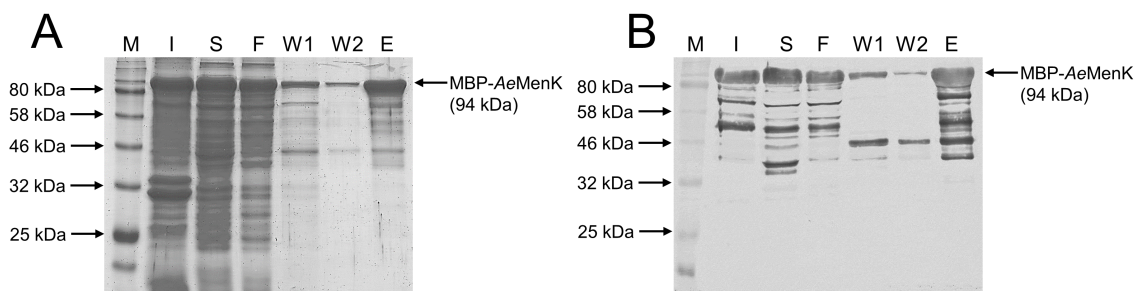


Abbildung 58 Reinigung des Fusionsproteins MBP-AeMenK. (A), Nach der Reinigung wurden einzelne Fraktionen mittels eines 12,5 %igen SDS-PA-Gels analysiert. (B), Western-Blot eines identischen SDS-PA-Gels von (A). I, Membran-Fraktion (40 µg); S, Lösliche Fraktion (40 µg); F, Durchfluss (40 µg), W1, Wasch-Fraktion 1 (5 µg); W2, Wasch-Fraktion 2 (5 µg); E, Eluat (25 µg), M, Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB) (11-245 kDa).

Im SDS-PA-Gel ist auf der Höhe von ca. 94 kDa (erwartet: 98 kDa) das gereinigte MBP-AeMenK zu erkennen. Neben dem gereinigten Protein sind in der Elutionsfraktion diverse kleinere Proteine zu erkennen, die sich ebenfalls um Western-Blot nachweisen ließen. Daher wurde vermutet, dass es sich hier um Abbauprodukte des MBP-AeMenK Proteins handelte. Aus einem Liter Kultur wurden 64 mg MBP-AeMenK gereinigt. Das gereinigte Protein wurde anschließend in einem qualitativen Enzymtest eingesetzt (Kap. 6.4.14). Als Substrat diente MK₆, welches zuvor aus der Membran von *W. succinogenes* DSM 1740 mittels HPLC gereinigt wurde. Da MK₆ in dem verwendeten Puffer (50 mM KH₂PO₄; pH 7,4) nicht löslich ist, wurden MK₆-haltige Liposomen hergestellt (siehe Kap. 6.4.14). Anschließend wurden 10 µM MBP-AeMenK mit 400 µl Liposomen (entspricht 10 µg MK₆) und 5 µl 32 mM SAM (Endkonzentration 0,32 µM) gemischt. Die Reaktion wurde mit 20 mM Dithionit gestartet. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurden die Chinone extrahiert und mittels HPLC analysiert (Abb. 59).

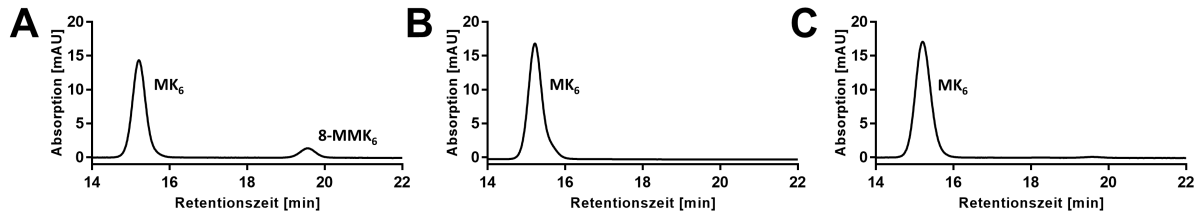


Abbildung 59 *In vitro* Nachweis für die Produktion von 8-MMK₆ durch das gereinigte MBP-AeMenK Protein. (A), MK₆-haltige Liposomen mit 20 mM DTT und 1 mM SAM mit das gereinigte MBP-AeMenK Protein. (B), Enzymtest wie in (A) aber ohne MBP-AeMenK. (C), Enzymtest wie in (A) aber ohne SAM. Nach der Inkubation bei 30 °C für 24 h wurden die Chinone wie beschrieben isoliert und mit der *W. succinogenes* spezifischen Chinon-HPLC Methode analysiert.

Die Analyse der *in vitro* Reaktion zeigte eine Bildung von 8-MMK₆, welches über die Retentionszeit (Abb. 59A) und das UV-Spektrum (nicht gezeigt) bestätigt wurde. In dem Ansatz ohne MBP-AeMenK wurde das MK₆ in den Liposomen nicht methyliert (Abb. 59B). Auch der Test mit MBP-AeMenK und Dithionit ohne SAM zeigte keine Methylierung des MK₆ (Abb. 59C). In dem rein qualitativen Test wurden jedoch nur geringe Mengen 8-MMK₆ gebildet.

10.2. Produktion und Reinigung von AeMenK-His

Die Reinigung durch die Maltose-Bindeprotein-Affinitätschromatographie lieferte eine hohe Ausbeute an Protein. Jedoch zeigte die Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot eine sehr inhomogene Proteinpräparation, die vermutlich auf einer Degradierung des Proteins beruhte. Um eine homogenere Proteinpräparation zu erhalten, wurde das Gen *AemenK* in den Vektor pET-28(a)+ kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Nach der Produktion des His-getaggten AeMenK Proteins (AeMenK-His; erwartete Masse: 57,6 kDa), wurde das Protein mithilfe der Immobilisierten-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt und mittels SDS-PAGE auf seine Reinheit geprüft (Abb. 60A).

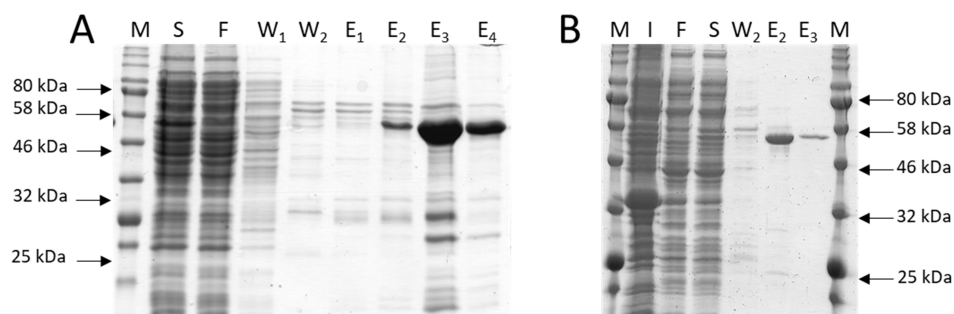


Abbildung 60 Reinigung des His-getaggten AeMenK Proteins. (A), Die Reinigung wurde wie in Kapitel 6.4.14 beschrieben mit 5 Säulenvolumen (CV) je Waschschritt durchgeführt. (B), Die entsprechende Reinigung mit 15 CV je Waschschritt. I, 25 µg Membran-Fraktion; S, 25 µg lösliche Fraktion; F 25 µg Durchfluss; W1, 10 µg Wasch-Fraktion 1; W2, 10 µg Wasch-Fraktion 2; E1, 10 µg Eluat Fraktion 1; E2, 25 µg Eluat Fraktion 2; E3, 25 µg Eluat Fraktion 3; M, Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa).

In den Elutionsfraktionen ist auf der Höhe von ca. 58 kDa das gereinigte AeMenK-His zu erkennen. Die Präparation wies jedoch starke Verunreinigungen auf, woraufhin bei einer zweiten Reinigung die Waschschrirte um 10 Säulenvolumina verlängert wurden (Abb. 60B). Durch das längere Waschen der Säule wurde ein Großteil der Verunreinigungen entfernt. Aus 3 l TB-Medium wurden 15,4 mg AeMenK-His gereinigt, was einer Ausbeute von 5,1 mg/l TB-Medium entspricht. Im Vergleich zur Reinigung mit dem MBP-Tag war die Ausbeute zwar um 76 % geringer, dafür war die Reinheit des Proteins deutlich höher als die des MBP-gereinigten Proteins. Im Weiteren wurde diese Proteinpräparation verwendet.

10.3. AeMenK-His besitzt ein sauerstoffsensibles [4Fe-4S]-Zentrum

Alle bisher bekannten Enzyme der radikalischen SAM Familie weisen mindestens ein [4Fe-4S]-Zentrum auf, wodurch sie in der Lage sind SAM umzusetzen und ein 5'-Desoxyadenosyl-Radikal (5-Ado-Radikal) sowie Methionin zu bilden. Wie in Abbildung 40 (Kapitel 8) gezeigt, besitzen die MenK/MqnK Proteine ein konserviertes C_{xxx}C_{xx}C Motiv, welches typisch für die Ligandierung eines [4Fe-4S]-Zentrums ist. Daher wurde nach der Reinigung von AeMenK der Eisen- und Sulfidgehalt bestimmt. Dieser lag bei $2,8 \pm 0,21$ mol Eisen pro mol Protein bzw. $3,1 \pm 0,15$ mol Sulfid pro mol Protein. Aufgrund dieser Werte ist anzunehmen, dass im Schnitt je ein Eisen- und Schwefelatom im Protein fehlen und das Eisen-Schwefel-Zentrum rekonstituiert werden muss. Dafür wurde das Protein wie in Kapitel 6.4.13 beschrieben in einem Hungate-Röhrchen anaerobisiert und mit Ammoniumeisen(II)-sulfat, Sulfid und DTT für 24 h anaerob auf Eis inkubiert. Nach der Entfernung des freien Eisens mittels einer PD-10 Säule wurde ein Eisengehalt von $3,69 \pm 0,36$ mol pro mol Protein bestimmt sowie ein Sulfidgehalt von $4,22 \pm 0,21$ mol pro mol Protein. Diese Stöchiometrie entspricht der Anwesenheit eines [4Fe-4S]-Zentrums. Für den Nachweis des Zentrums wurden Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 270 bis 580 nm aufgenommen (Abb. 61).

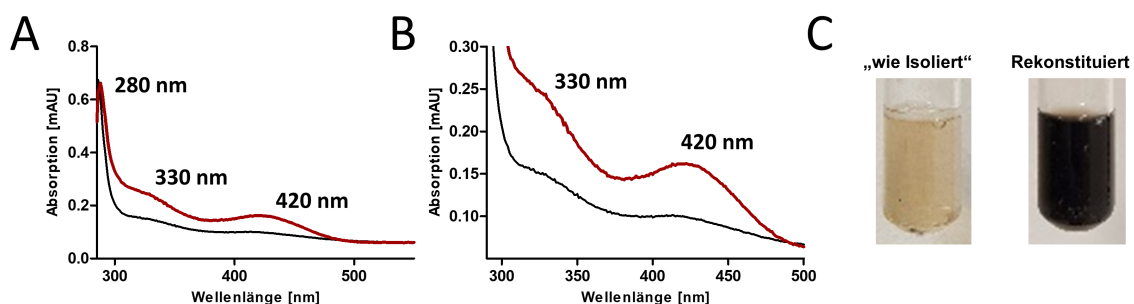


Abbildung 61 UV-VIS-Spektren von AeMenK (3 mg/ml) vor und nach der Rekonstitution des [4Fe-4S]-Zentrums. (A), Gesamtes Spektrum. In schwarz zu erkennen ist das Spektrum von gereinigtem AeMenK-His und in Rot ist das Spektrum des rekonstituierten MenK Proteins zu sehen. Die drei Maxima (280 nm: proteineigene Absorption; 330nm und 420 nm: spezifische Maxima des [4Fe-4S]-Zentrums) sind deutlich zu erkennen. (B), Vergrößerter Ausschnitt von A. (C), Fotos des gereinigten AeMenK-His (je 3 mg/ml) vor der Rekonstituierung („wie Isoliert“) und danach.

In den Spektren ist deutlich die Zunahme der Absorption bei 330 nm und 420 nm zu erkennen, wobei sich die proteinabhängige Absorption bei 280 nm nicht ändert. Das Maximum bei 420 nm entspricht dem charakteristischen Signal des [4Fe-4S]-Zentrums und stimmt mit dem Maximum von anderen radikalischen SAM Proteinen wie GenK oder BlsE überein (Broderick *et al.*, 2014). Auch visuell zeigte sich eine Veränderung des Proteins: es besaß vor der Rekonstitution eine leichte gelbliche Färbung während es nach der Rekonstitution dunkelbraun war. Die [4Fe-4S]-Zentren von radikalischen SAM-Enzymen gelten als sauerstoffempfindlich, da molekularer Sauerstoff in der Lage ist das nicht-ligandierte Eisenatom zu oxidieren. Tatsächlich war nach der Exposition des rekonstituierten AeMenK-His Proteins mit Sauerstoff eine kontinuierliche Abnahme des charakteristischen Maximums für das [4Fe-4S]-Zentrum bei 420 nm zu erkennen (Abb. 62). Dieses Ergebnis belegt die Sauerstoffempfindlichkeit des AeMenK-His Proteins.

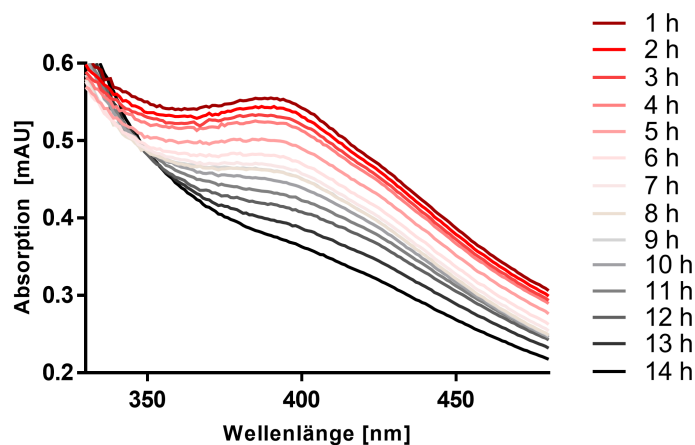


Abbildung 62 UV-VIS Spektren von AeMenK-His nach Exposition mit Sauerstoff. 1 ml des rekonstituierten AeMenK-His-Proteins (3 mg/ml) wurden mit 10 ml Luft für 3 min durchgast. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 14 h stündlich ein UV-VIS Spektrum aufgenommen.

10.4. Bestimmung des Redoxpotentials des Eisen-Schwefel-Zentrums von AeMenK-His

Neben der spektroskopischen Untersuchung von AeMenK-His, wurden die elektrochemischen Eigenschaften des Proteins mittels Cyclovoltammetrie charakterisiert. Durch die Anwesenheit des Eisen-Schwefel-Zentrums sollte AeMenK-His in der Lage sein ein Elektron aufzunehmen und wieder abzugeben (Abb. 63A). Dieser reversible Prozess besitzt ein bestimmtes Mittelpunktspotential. Zur Ermittlung dieses Potentials wurden wie in Kapitel 6.5.4 beschrieben 150 μM AeMenK-His in anaerober Elektrolytlösung (3 M KCl, pH 7,0) unterschiedlichen Spannungen von -0,1 V bis -1 V ausgesetzt (Abb. 63 B und C).

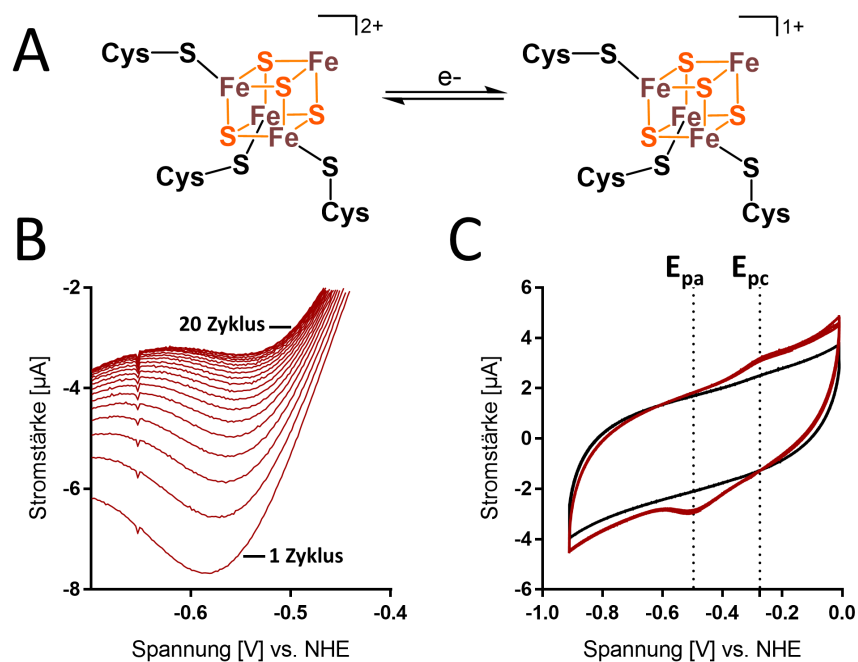


Abbildung 63 Elektrochemische Charakterisierung von AeMenK-His mittels Cyclovoltammetrie. (A), Darstellung der Elektronenaufnahme und -abgabe von MenK durch das Eisen-Schwefel-Zentrum, welches von 3 konservierten Cysteinen ligandiert wird. (B), Stabilisierung des Redoxpotentials des [4Fe-4S]-Zentrums über die ersten 15 Zyklen. (C), Cyclovoltammogramm von AeMenK (rot) und Puffer (schwarz). E_{pa} , Anodisches Signalpotential; E_{pc} , Kathodisches Signalpotential.

Die Aufnahme und Abgabe des Elektrons ist im Cyclovoltammogramm gegenüber der Kontrolle am anodischen bzw. kathodischen Signalpotential zu erkennen. Nach der Stabilisierung des Potentials innerhalb von 15 Zyklen wurde ein E_{pa} von -496 mV und ein E_{pc} von -275 mV des Eisen-Schwefel-Zentrums unter Verwendung der Software EC-lab V10.12 ermittelt. Basierend auf diesen beiden Potentials wurde ein Standardredoxpotential von $E_0' = -386\text{ mV}$ für das [4Fe-4S]-Zentrum von AeMenK-His berechnet. Mit diesem Standardredoxpotential befindet sich das Potential im typischen Bereich (-340 bis -400 mV) für [4Fe-4S]-Zentren (Kühner *et al.*, 2016).

10.5. Methylierung von MK₄ durch AeMenK-His

Mit dem rekonstituierten Protein wurde unter anaeroben Bedingungen ein Aktivitätstest durchgeführt (s. Kap. 6.4.14 für Details). Das Ziel des Aktivitätstests bestand darin, die Reaktionsprodukte per LC-MS zu detektieren und so den Reaktionsmechanismus aufzuklären. Da Lipide oder Detergenzien in einer LC-MS basierten Analyse störend sind, wurde anstelle von MK₆ das weniger hydrophobe Menachinon MK₄ eingesetzt. Dieses bleibt bei Konzentrationen von bis zu 150 μM in wässriger Lösung stabil und fällt nicht aus, sodass keine Liposomen benötigt wurden. Für den Enzymtest wurden Substratkonzentrationen von 120 μM MK₄ und 1 mM SAM eingesetzt. Als Elektronendonator diente 1 mM Dithionit, welches in wässriger Lösung ein Elektron auf ein geeignetes Substrat wie ein [4Fe-4S]-Zentrum übertragen kann. Nach der Inkubation von 50 μM AeMenK-His mit allen Komponenten bei 30 °C für 1 h wurde lediglich eine kaum nachweisbare Menge 8-MMK₄ (0,05 μM) mittels HPLC-MS wie in Kapitel 6.4.14 beschrieben gemessen. Die Inkubationszeit wurde daher auf 24 h verlängert, woraufhin eine 8-MMK₄ Konzentration von 1,1 μM nachgewiesen wurde (Abb. 64).

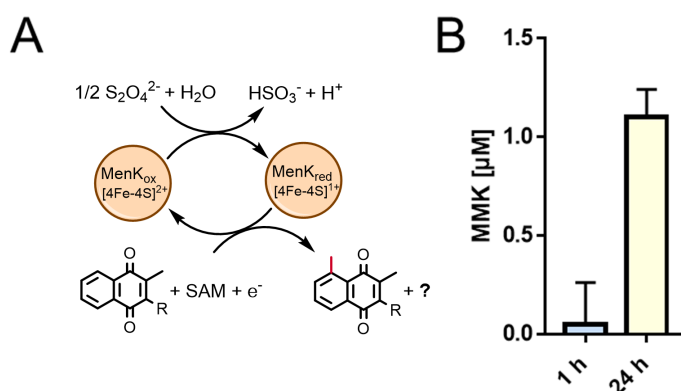


Abbildung 64 Enzymtest mit AeMenK-His. (A), Schema des Enzymtests. Dithionit disproportioniert in Wasser und überträgt ein Elektron auf AeMenK-His, wodurch das [4Fe-4S]²⁺ zu [4Fe-4S]¹⁺ reagiert. Anschließend kann AeMenK-His mit SAM das Menachinon methylieren. R, Isoprenoidseitenkette. (B), Gemessene 8-Methylmenachinon-4 Konzentration durch Umsetzung von Menachinon-4 nach 1 h und 24 h ($n=3$).

Aufgrund der geringen Aktivität konnten die Reaktionsprodukte von SAM mit diesem Assay nicht bestimmt werden. Um eine höhere Aktivität zu erreichen, wurde versucht ein natürliches Redoxsystem zu nutzen. Das Fpr/FldA-Redoxsystem gilt als eines der am besten verstandenen Systeme. In diesem System dient NADPH als Elektronendonator. Dieses wird durch die Flavodoxin-Reduktase Fpr oxidiert, wodurch zwei Elektronen auf den Fpr Kofaktor FAD übertragen werden. Dieses reduzierte Fpr ist in der Lage die Elektronen auf den Kofaktor FMN des Flavodoxins FldA zu übertragen. Das FldA fungiert in reduzierter Form in biologischen Systemen als Elektronendonator für unterschiedliche Proteine. In dem hier durchgeführten Assay reduziert FldA das rekonstituierte AeMenK-His, welches im Anschluss das MK₄ mithilfe von SAM methyliert wird (Abb. 65).

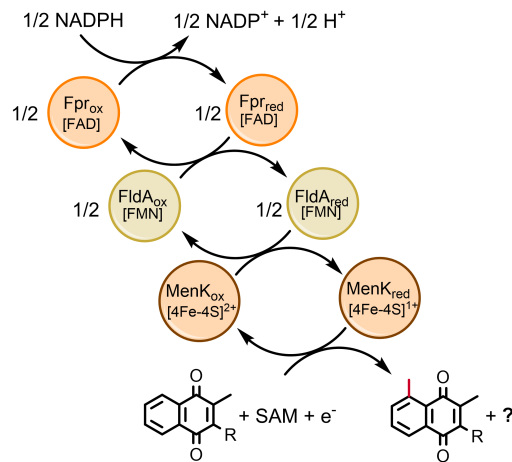


Abbildung 65 Schematische Darstellung des Methylierungsassays von MenK mit dem natürlichen Fpr/FldA-Redoxsystem. Fpr oxidiert NADPH und überträgt die Elektronen auf FldA. Anschließend werden die Elektronen über FldA auf *Ae*MenK übertragen. *Ae*MenK methyliert anschließend Menachinon in Anwesenheit von SAM. R, Isoprenoidseitenkette.

Da die beiden Proteine Flavodoxin-Reduktase und Flavodoxin kommerziell nicht erhältlich sind, wurden sie in *E. coli* produziert und gereinigt. Wie in Kapitel 6.4.12 beschrieben, wurden die Gene *fpr* und *fldA* aus *E. coli* MG1655 mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pET28a(+) kloniert. Anschließend wurden beide Vektoren in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und die Gene *fpr* und *fldA* exprimiert. Nach der Zellyse wurden die benötigten Kofaktoren (FAD und FMN) dem Zellextrakt hinzugeführt und die His-getaggtten Proteine Fpr (erwartet: 31,5 kDa) und FldA (erwartet: 23,6 kDa) mittels IMAC gereinigt (Abb. 66A und B). Das Vorhandensein der Kofaktoren FAD und FMN wurde mittels UV/VIS Spektroskopie bestätigt (Abb. 66C und D).

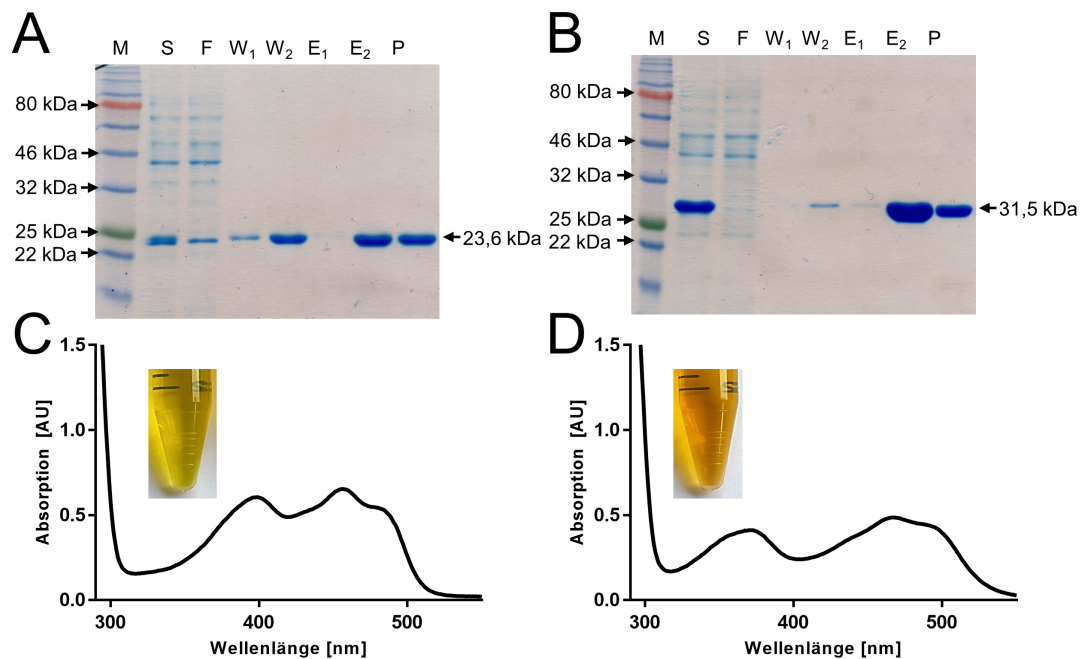


Abbildung 66 Reinigung und spektroskopische Untersuchung von FldA und Fpr. (A), Analyse der Reinigung von Fpr mittels SDS-PAGE. (B), Analyse der Reinigung von FldA mittels SDS-PAGE. (C), UV/Vis-Spektrum von 90 μM Fpr mit den charakteristischen Maxima der Kofaktoren FAD und FMN bei 398 nm, 456 nm und 485 nm. (D), UV/Vis-Spektrum von 60 μM FldA mit den charakteristischen Maxima bei 373 nm, 467 nm und 497 nm. M: Marker; Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB); S: 15 μg lösliche Fraktion; F: 15 μg Durchlauf; W1: 15 μg Waschfraktion 1; W2: 15 μg Waschfraktion 2; E1: 5 μg Elutionsfraktion 1; E2: 5 μg Elutionsfraktion 2; P: 5 μg Protein nach der Konzentrierung.

Anschließend wurden über die Extinktionskoeffizienten der gereinigten Proteine (FldA: $E_{467\text{nm}}: 8,25103 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und Fpr: $E_{456\text{nm}}: 7,1103 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Proteinkonzentration und die Ausbeute berechnet. Es wurden pro Liter *E. coli*-Kultur 54,4 mg FldA und 45,7 mg Fpr erhalten.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob das Fpr/FldA-System in der Lage ist NADPH zu oxidieren und mit den Elektronen ein Akzeptor-Molekül wie Cytochrom *c* zu reduzieren. Dafür wurden 20 μM Pferdeherz-Cytochrom *c* mit 20 μM FldA und 20 μM Fpr inkubiert. Anschließend wurde sukzessive NADPH bis zu einer Endkonzentration von 28 μM hinzugegeben und das Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 420 nm bis 600 nm gemessen (Abb. 67A).

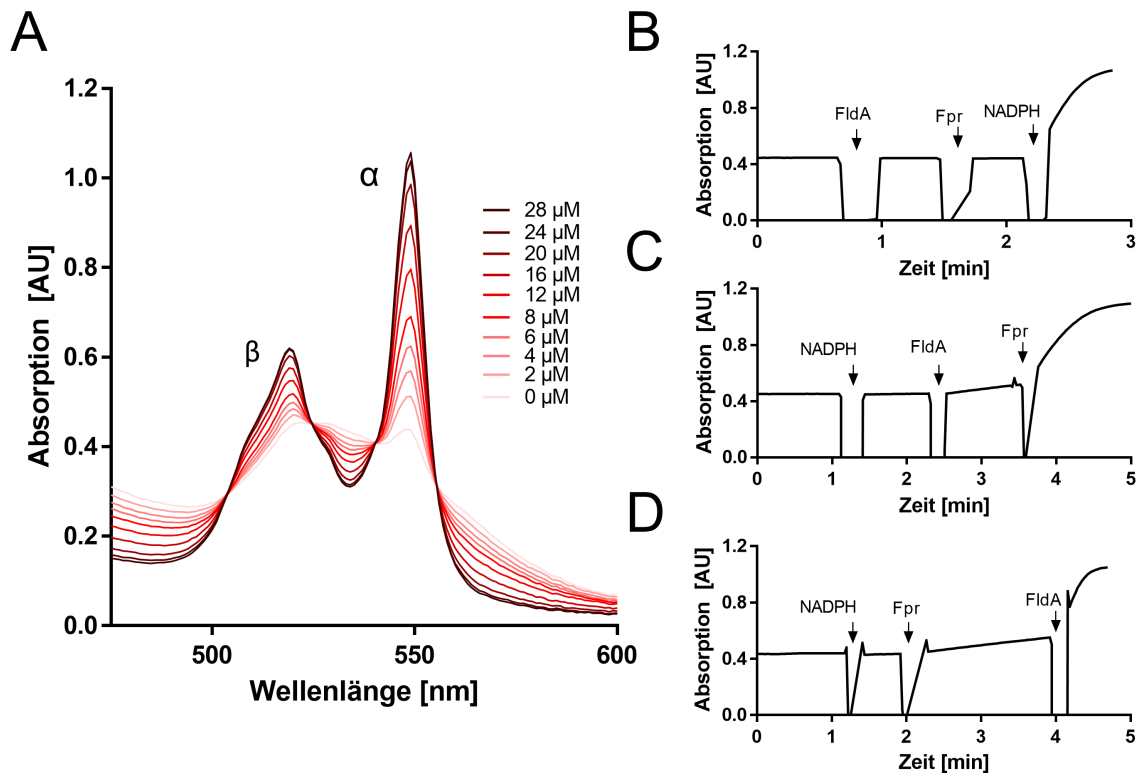


Abbildung 67 Nachweis der Redoxaktivität des NADPH/Fpr/FldA-Systems. (A), Reduktion von Pferdeherz-Cytochrom *c* durch NADPH. Zu 20 μ M oxidiertem Cyt. *c*, 20 μ M FldA und 20 μ M Fpr (in 50 mM Tris pH 8,0) wurde NADPH in Schritten von 2 μ M bzw. 4 μ M NADPH zugegeben. Nach je einer Minute wurde das Absorptionsspektrum gemessen. Durch die Entwicklung der α - und β -Banden ist zu erkennen, dass das Cytochrom *c* reduziert wird. (B-D), Nachweis, dass die Reduktion vom gesamten NADPH/Fpr/FldASystem abhängig ist. Die Absorption bei 550 nm wurde über die Zeit verfolgt und die einzelnen Komponenten wurden in unterschiedlicher Reihenfolge zum Cytochrom *c* hinzugegeben. Erst nachdem alle Komponenten zugegeben waren, war ein Anstieg der Absorption bei 550 nm zu erkennen.

Durch die sukzessive Zugabe von NADPH ist der Anstieg der α - und β -Bande des Cytochrom *c*-Spektrums zu erkennen. Dies deutet auf eine Reduktion des Cyt. *c* durch das NADPH/Fpr/FldA-System hin (Abb. 67A). Im Anschluss wurde getestet, ob die Reduktion von Cyt. *c* von allen Einzelkomponenten des NADPH/Fpr/FldA-Systems abhängig ist (Abb. 67B-D). Dafür wurde die Veränderung der α -Bande bei 550 nm nach der Zugabe der unterschiedlichen Komponenten beobachtet. In Abbildung 67B ist zu erkennen, dass die Reduktion von Cyt. *c* erst beginnt nachdem alle drei Komponenten im Ansatz vorhanden sind. Ein entsprechendes Ergebnis ist auch in Abbildung 67C und D zu erkennen. Hier wurde jeweils die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten verändert, was aber ebenfalls erst zu einem Anstieg der Absorption führte, nachdem alle drei Komponenten vorhanden waren.

Nach der erfolgreichen Etablierung des Fpr/FldA-Redoxsystems, wurden im AeMenK-Aktivitätstest anstelle des Dithionits die Komponenten des Fpr/FldA-Redoxsystems eingesetzt (Kapitel 6.4.14). Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C wurden die Chinone im Reaktionsansatz analysiert und die 8-MMK₄-Konzentration ermittelt. Es wurde eine Konzentration von $22,8 \mu\text{M} \pm 4,5 \mu\text{M}$ 8-MMK₄ ermittelt. Im Vergleich zur Ausbeute von $1,1 \mu\text{M}$ 8-MMK₄ mit Dithionit als Elektronendonator, entspricht dies einer etwa 20-fachen Aktivitätssteigerung. Dadurch war es nunmehr möglich die einzelnen Produkte des SAM-Umsatzes nachzuweisen.

10.6. Substrate und Produkte der Methylierungsreaktion von AeMenK-His

Zur ersten qualitativen Analyse der einzelnen Produkte, wurde der Testansatz wie in Kapitel 6.4.14 beschrieben mit und ohne AeMenK-His für je 24 h inkubiert. Für die Analyse wurden die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) bzw. das UV_{260nm}-Chromatogramm der einzelnen Stoffe mit dem jeweiligen Standard verglichen. So ist in Abbildung 68A zu erkennen, dass sich 8-MMK₄ nur bildet, wenn AeMenK-His dem Enzymtest hinzugesetzt wurde. Dagegen wurde es weder in dem MK₄-Standard noch im SAM-Standard nachgewiesen. Das entstandene 8-MMK₄ zeigt mit Absorptionsmaxima bei 248 nm, 265 nm und 345 nm das typische UV-VIS Spektrum von C-8 methyliertem Menachinon (Abb. 68B). Ebenso konnte 5'-Desoxyadenosin (5-Ado) nur in dem vollständigen Enzymtest detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte 5'-Thioadenosin (t-Ado) in keinem der beiden Enzymtest nachgewiesen werden (Abb. 68C und D). In Abbildung 68E und F ist zu erkennen, dass im SAM-Standard bereits 5'-Methylthioadenosin (MTA) bzw. S-Adenosylhomocystein (SAH) vorhanden sind. Dies liegt an der Instabilität von SAM, das bei längerer Lagerung zu MTA oder SAH zerfällt. Daher ist es nicht ungewöhnlich diese Abbauprodukte in kommerziell erworbenem SAM zu identifizieren. Es scheint jedoch, dass die SAH Menge im vollständigen Enzymtest nach der Inkubation höher ist als ohne das Enzym.

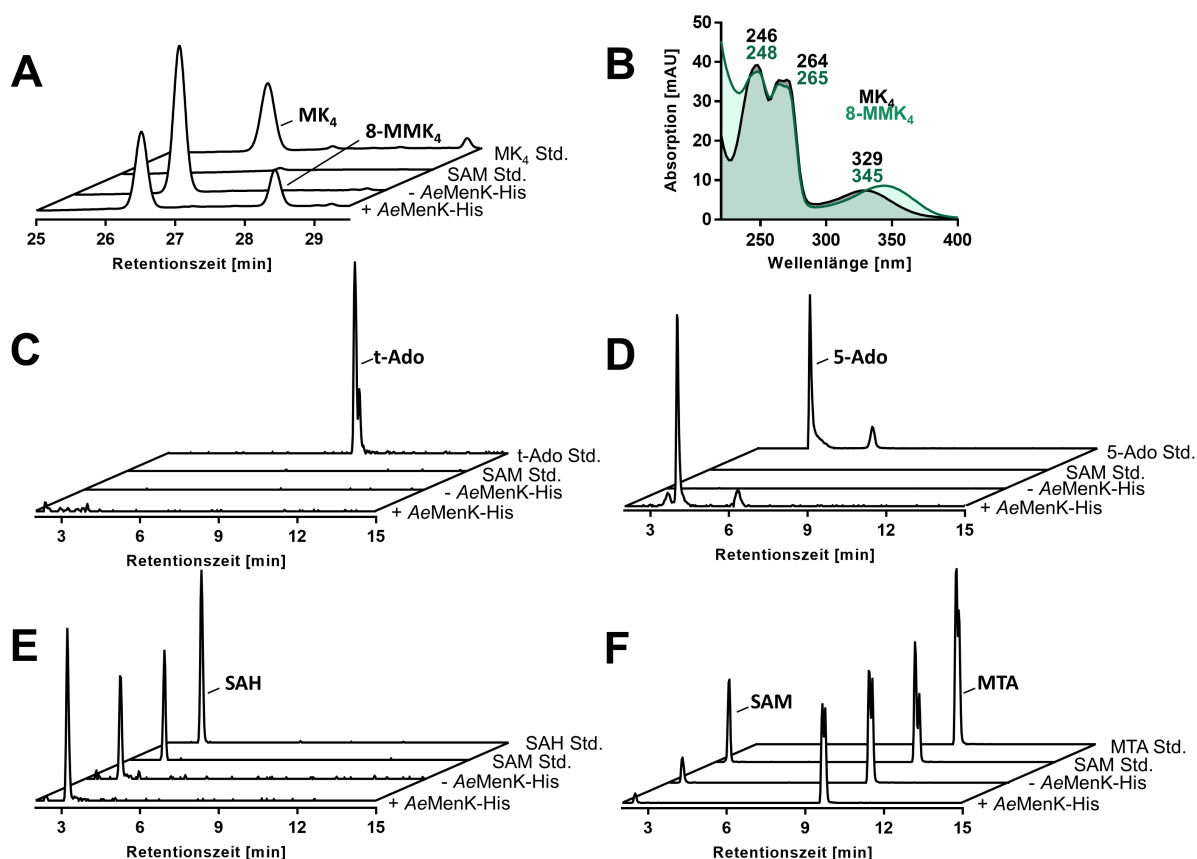


Abbildung 68 Produkte der AeMenK-His Reaktion. (A), UV-Chromatogramme bei 260 nm zur Analyse der Bildung von 8-MMK₄. (B), UV-VIS-Spektren der aus in (A) gezeigten Daten bei einer Retentionszeit von 26,5 min (MK₄) und 28,4 min (8-MMK₄) zur Identifizierung der Chinonspezies. (C – F), Extrahierte Ionenchromatogramme zur Analyse der Bildung von [SAH+H]⁺ (385,4 *m/z*), [MTA+H]⁺ (298,3 *m/z*), [t-Ado+H]⁺ (284,3 *m/z*) und [5-Ado+H]⁺ (252,2 *m/z*). Reihenfolge der Chromatogramme von oben nach unten: 20 µM Standard des jeweiligen zu analysierenden Stoffes; 20 µM SAM Standard; Enzymtest nach 24 h ohne AeMenK-His; Enzymtest nach 24 h mit AeMenK-His. Die Enzymtests wurden wie im Methodenteil 6.4.14 beschrieben durchgeführt und anschließend mittels der LC-MS analysiert.

Im nächsten Schritt wurde die Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 0; 1; 2,5; 5 und 24 h) analysiert, um die Substrat/Produkt-Stöchiometrie der Methylierungsreaktion von AeMenK-His zu untersuchen. Über die Flächen der extrahierten Ionen-Chromatogramme (EIC) für MMK₄, 5-Ado, SAH und MTA wurden die entstandenen Konzentrationen berechnet und graphisch aufgetragen (Abb. 69).

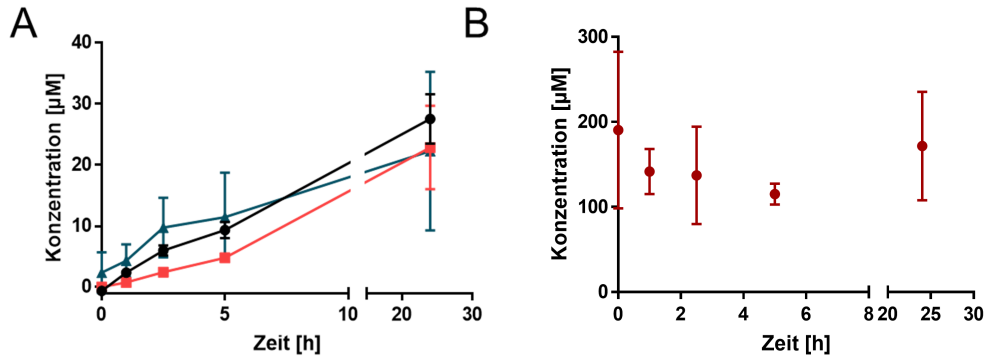


Abbildung 69 Analyse der Reaktionsprodukte im AeMenK-His-Enzymtest. Der Assay wurde mit 50 μM AeMenK, 1 mM SAM und dem NADPH/Fpr/FldA-System durchgeführt. (A), Entstandene Konzentrationen der Produkte 5-Ado (Kreise, Schwarz), SAH (Dreieck, Blau) und 8-MMK₄ (Viereck, Rot) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (B), Konzentrationen von MTA zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($n=3$). Das Substrat SAM wurde aufgrund seiner Instabilität nicht quantifiziert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Wie in Abbildung 69A zu erkennen ist, steigen die Konzentrationen von SAH, 5-Ado und 8-MMK₄ mit der Zeit proportional an. Das Verhältnis der Produkte SAH : 5-Ado : 8-MMK₄ liegt nach 24 h bei 1 : 1,2 : 1. Die Konzentration von MTA liegt bereits am Anfang bei $190 \mu\text{M} \pm 65 \mu\text{M}$, und ändert sich auch nach 24 Stunden nicht signifikant (Abb. 69B). t-Ado ist zu keinem Zeitpunkt zu detektieren (nicht gezeigt).

Für die Klasse C RSMT NosN wurde postuliert, dass es t-Ado in Gegenwart von Homoserinlacton (HSL) zu SAH umsetzen kann (Ji *et al.*, 2018). Um diese These für MenK zu überprüfen, wurden 50 μM t-Ado mit 200 μM HSL und 20 μM MenK für 15 bzw. 60 min bei 30 °C inkubiert. Nach der Analyse ist in den Chromatogrammen zu erkennen, dass die UV-Absorption von t-Ado (RT: 9,25 min) im Vergleich zur Kontrolle ohne MenK nach 15 min bereits abnimmt und nach 60 min im UV-Spektrum kaum mehr detektierbar ist (Abb. 70). Dafür ist bei einer RT von 3,94 min ein immer größer werdendes Signal zu erkennen.

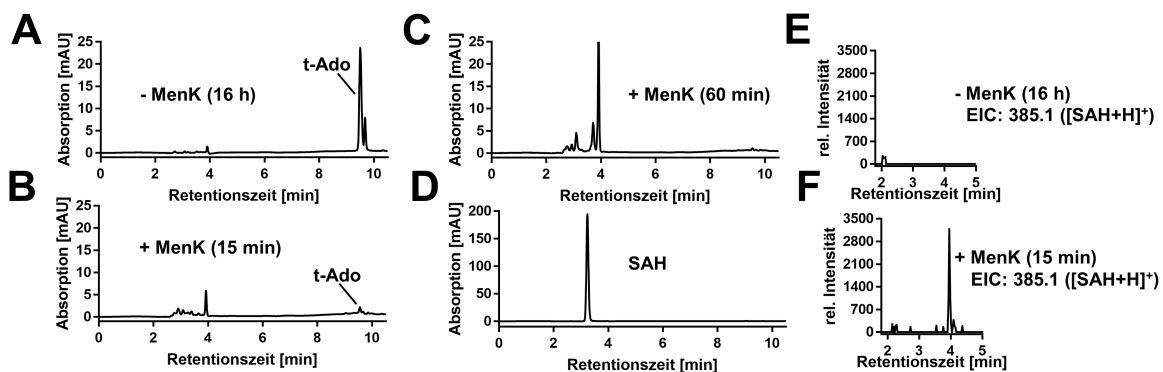


Abbildung 70 Reaktion von 50 μM t-Ado mit 200 μM HSL. (A), Ohne AeMenK-His und Inkubation bei 30 °C über 16 h. (B), 20 μM AeMenK-His nach 15 min Inkubation bei 30 °C. (C), 20 μM AeMenK-His nach 60 min Inkubation bei 30 °C. (D), 20 μM SAH Standard. (E), EIC: 385.1 von (A). (F), EIC: 385.1 von (B).

In dem extrahierten Ionen-Chromatogramm mit der Masse von $[\text{SAH}+\text{H}]^+$ ($385,1 \text{ m/z}$) ist ebenfalls bereits nach 15 min das Signal bei einer RT von 3,94 min zu erkennen. Da dieses Signal jedoch im Vergleich zum SAH-Standard (Abb. 70D) eine andere Retentionszeit besitzt, konnte die Produktion von SAH aus t-Ado und HSL nicht bestätigt werden.

10.7. Identifizierung von möglichen Nebenprodukten

Um mögliche Nebenprodukte der Reaktion nachzuweisen, wurden die Proben nach 24 h Inkubation aus Abbildung 69 zusätzlich zur HPLC-ESI-MS mittels der HPLC-APCI-HR-MS analysiert (Abb. 71A). Die Massen von $[\text{MK}_4+\text{H}]^+$ ($445,3 \text{ m/z}$) und $[\text{8-MMK}_4+\text{H}]^+$ ($459,3 \text{ m/z}$) konnten eindeutig den Signalen bei einer RT von 24,4 min bzw. 25,3 min zugeordnet werden und bestätigten die Bildung von 8-MMK₄ (Abb. 70B-C). Des Weiteren fiel in den extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC) von MK₄ und 8-MMK₄ auf, dass Signale mit identischen Massen jedoch mit geringeren Intensitäten von 5×10^5 auch in einem Bereich von 22 min – 24 min gefunden wurden. Bei näherer Betrachtung des MS-Spektrums bei einer RT von 23 min ist zu erkennen, dass der eigentliche Basispeak eine Masse von $457,319 \text{ m/z}$ besitzt. Dies entspricht der Masse eines 8-Methylen-MK₄ Radikals, welches als Fragmentierungsprodukt des Nebenprodukts entstanden sein könnte, das in Abbildung 71E gezeigt ist.

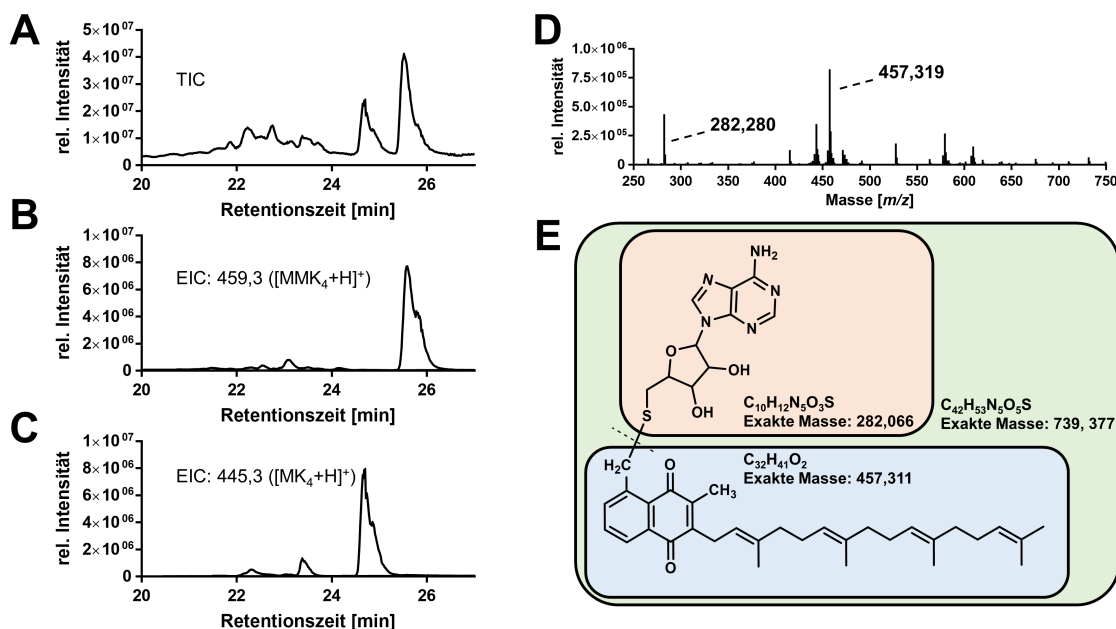


Abbildung 71 Identifizierung von Nebenprodukten mittels HPLC-HR-APCI-MS im Bereich von 20 min bis 27 min. (A), Totales Ionen Chromatogramm von AeMenK nach dem Enzymtest mit dem Fpr/FldA Redoxsystem nach 24 h. (B), Extrahiertes Ionen Chromatogramm von $[\text{8-MMK}_4+\text{H}]^+$ ($459,3 \text{ m/z}$). (C), Extrahiertes Ionen Chromatogramm von $[\text{MK}_4+\text{H}]^+$ ($445,3 \text{ m/z}$). (D), MS-Spektrum bei einer Retentionszeit von 23 min aus A. (E), Mögliches Nebenprodukt mit den jeweiligen putativen Fragmenten und Massen.

Im MS-Spektrum ist zudem eine hohe Intensität für die Masse 282,280 m/z zu erkennen. Addiert man 457,319 m/z und 282,280 m/z miteinander, erhält man eine Masse von 739,599 m/z . Dies entspricht mit einer Abweichung von 0,222 m/z einem möglichen Nebenprodukt der Reaktion von MenK, bei dem MTA kovalent an Methylmenachinon-4 gebunden ist. Da diese Abweichung jedoch bei einer hochauflösenden MS Messung zu hoch ist, ist dies kein eindeutiger Beweis für das Molekül, sondern sollte lediglich als Indiz betrachtet werden. Ein Moleküllenpeak für die Masse 740,377 m/z für das [Nebenprodukt+H]⁺ konnte nicht detektiert werden.

10.8. Analyse der Methylierungsreaktion mithilfe von deuterierten Substraten

Zur weiteren Charakterisierung der Methylierung von MK₄ durch AeMenK-His wurden mit Deuterium markierte Substrate eingesetzt. Durch diese Markierung ist es möglich, einzelne Wasserstoffatome zu verfolgen und damit ein besseres Verständnis für die Reaktion zu bekommen. Im Folgenden ist die Massenverschiebung durch die Deuterierung für MK₄ und für SAM gezeigt (Abb. 72).

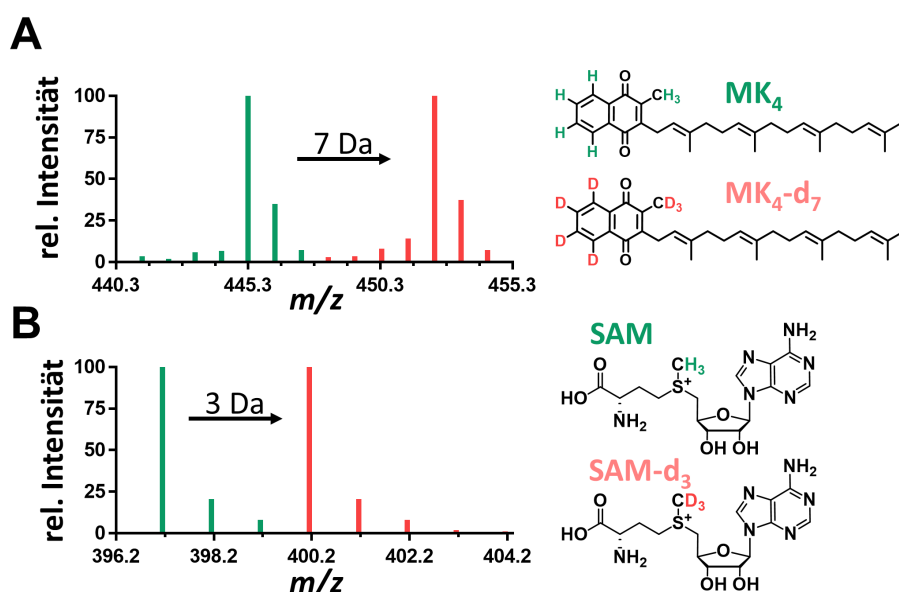


Abbildung 72 Vergleich der MS-Spektren von deuterierten und nicht-deuterierten Substraten. (A), MS-Spektrum von MK₄ (grün) und dem deuterierten MK₄-d₇ (rot). Deutlich im MS-Spektrum zu erkennen ist der Massenunterschied von 7 Dalton. (B), MS-Spektrum von SAM (grün) und dem deuterierten SAM-d₃ (rot). Deutlich im MS-Spektrum zu erkennen ist der Massenunterschied von 3 Dalton.

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde sämtliches Wasser durch Deuteriumoxid (D_2O) ersetzt. Dafür wurden auch die eingesetzten Proteine Fpr, FldA und AeMenK-His mithilfe einer PD-10 Säule in D_2O -haltigen Puffer (50 mM Tris, pD 8,0) wie in Kapitel 6.4.15 beschrieben überführt. Nach dem Umpuffern wurde die Aktivität der Proteine wie in Kapitel 6.4.14 beschrieben nachgewiesen (Abb. 73). Als Kontrolle wurde dieselbe Reaktion mit unmarkierten Substraten in wässrigem Puffer durchgeführt.

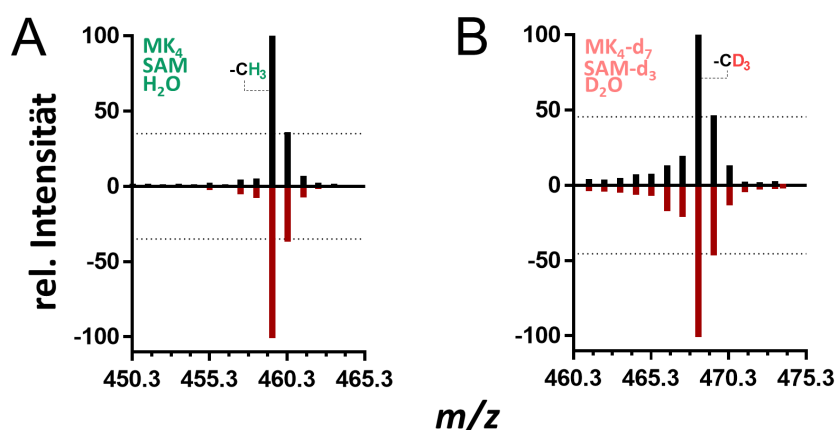


Abbildung 73 MS-Spektren des Produkts bei einer Retentionszeit von 25,5 min (8-MMK₄) der durch AeMenK-His katalysierten Enzymreaktion mit (A) natürlichen Substraten und (B) deuterierten Substraten. Das jeweilige methylierte Menachinon konnte anhand der Masse identifiziert werden: (A), [MK₄-CH₃+H]⁺: 459,3 m/z , (B), [MK₄-d₇-CD₃+H]⁺: 468,3 m/z . Die Ansätze wurden 1 h (Schwarz) bzw. 24 h (Rot) bei 30 °C inkubiert und anschließend mittels HPLC-APCI-HR-MS analysiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Fällen die methylierte Variante ([MK₄-CH₃+H]⁺: 459,3 m/z und [MK₄-d₇-CD₃+H]⁺: 468,3 m/z) bereits nach einer Stunde in der Analyse gefunden wurde (Abb. 73). Auch nach einer Inkubation des Ansatzes für 24 h bei 30 °C wurden beide Produkte identifiziert und das Isotopenverhältnis der methylierten Produkte hatte sich nicht wesentlich geändert.

Im nächsten Schritt wurden alle 8 möglichen Kombinationen aus deuterierten und natürlichen Substraten angesetzt. Anschließend wurden sie für 1 h bzw. für 24 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurden das Isotopenmuster des methylierten MK₄ mittels HPLC-APCI-HR-MS untersucht. Die Massenspektren des methylierten MK₄ sind in Abbildung 74 dargestellt.

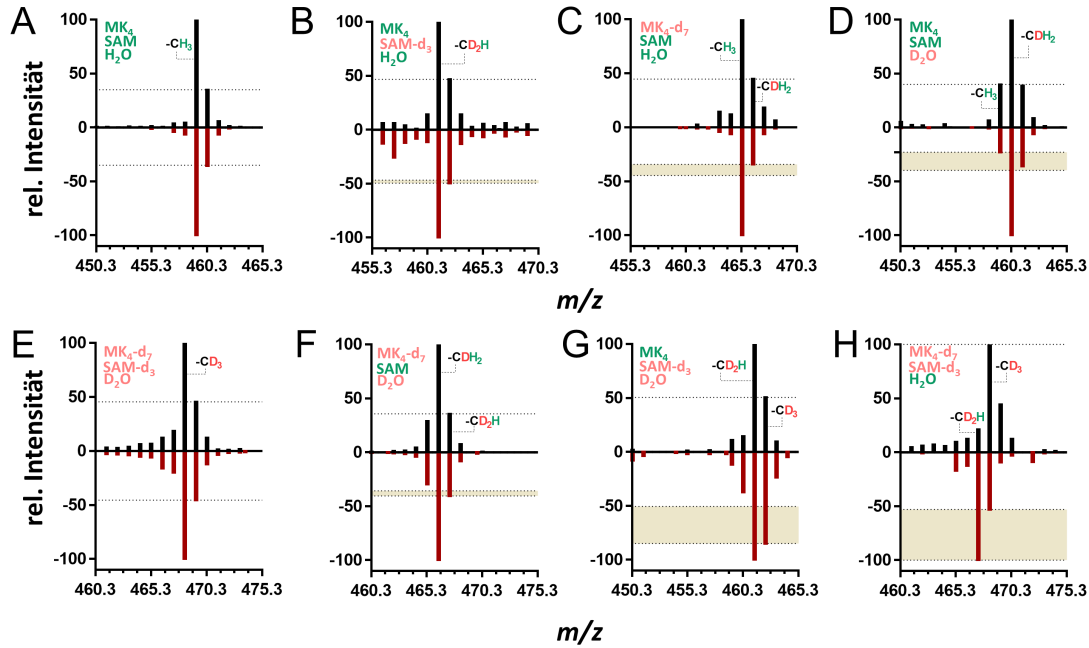


Abbildung 74 MS-Spektren von 8-MMK4 der Enzymreaktionen mit verschiedenen Kombinationen aus natürlichen bzw. deuterierten Substraten. Die Reaktionen wurden 1 h (schwarz) und 24 h (rot) bei 30 °C inkubiert und anschließend mittels HPLC-APCI-HR-MS analysiert. Das MS-Spektrum wurde bei einer Retentionszeit von 25,5 min analysiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden folgende methylierte Chinone identifiziert (intensivste Isotopenpeaks): (A), $[\text{MK}_4\text{-CH}_3\text{+H}]^+$: 459,3 m/z ; (B), $[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CH}_3\text{+H}]^+$: 465,3 m/z ; (C), $[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CH}_3\text{+H}]^+$: 465,3 m/z ; (D), $[\text{MK}_4\text{-CDH}_2\text{+H}]^+$: 460,3 m/z ; (E), $[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CD}_3\text{+H}]^+$: 468,3 m/z ; (F), $[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CDH}_2\text{+H}]^+$: 466,3 m/z ; (G), $[\text{MK}_4\text{-CD}_2\text{H+H}]^+$: 461,3 m/z ; (H), $[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CD}_3\text{+H}]^+$: 468,3 m/z . Sofern D_2O eingesetzt wurde, wurden die Proteine in D_2O haltigem Puffer umgepuffert. Die braunen Bereiche zeigen die Veränderung des intensivsten Isotopenpeaks nach einer Reaktionszeit von 24 h im Vergleich zu der Reaktion nach 1 h.

Die in Abbildung 74A und E dargestellten MS-Spektren zeigen den erwarteten Basispeak bei einer Masse von 459,3 m/z für die $-\text{CH}_3$ Gruppe am MK_4 bzw. einer Masse von 468,3 m/z für die $-\text{CD}_3$ Gruppe am $\text{MK}_4\text{-d}_7$. Durch den Tausch von SAM gegen SAM-d_3 (Abb. 74B) ist im Ansatz nach 1 Stunde zu erkennen, dass der Basispeak nicht die Masse von $[\text{MK}_4\text{-CD}_3\text{+H}]^+$ (462,3 m/z) besitzt, sondern eine Masse von 461,3 m/z . Dies entspricht einem $[\text{MK}_4\text{-CD}_2\text{H+H}]^+$ Molekül. Die Reaktion mit $\text{MK}_4\text{-d}_7$ und SAM in deuteriertem Puffer ergab anstelle eines Basispeaks von 465,3 m/z ($[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CH}_3\text{+H}]^+$) einen Basispeak mit einer Masse von 466,3 m/z ($[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CDH}_2\text{+H}]^+$) (Abb. 74F). Betrachtet man diese Spektren (Abb. 74 B und F), so erkennt man auch nach 24 h nur eine geringfügige Änderung des Isotopenmusters.

Durch den Austausch von MK_4 gegen die deuterierte Variante ist nach einer einstündigen Reaktion ein Basispeak von 465,3 m/z zu erkennen, was dem von $[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CH}_3\text{+H}]^+$ entspricht (Abbildung 74C). Es fällt jedoch auf, dass sich nach 24 h Stunden das Isotopenmuster geändert hat. Das Signal mit einer Masse von 466,3 m/z ($[\text{MK}_4\text{-d}_7\text{-CDH}_2\text{+H}]^+$) ist um 11,2 % gesunken. Dieser Effekt ist noch deutlicher in Abbildung 74G zu erkennen. Im Vergleich zu Abbildung 74E

wurde statt des MK₄-d₇ das MK₄ eingesetzt. Es ist deutlich ein Basispeak für [MK₄-CD₂H+H]⁺ (461,3 *m/z*) zu erkennen. Daneben liegt der Isotopenpeak bzw. der Molekülionenpeak für [MK₄-CD₃+H]⁺ (462,3 *m/z*). Dieser besitzt nach 24 h beinahe dieselbe Intensität wie der Basispeak. Diese Beobachtung deutet auf einen Austausch der Protonen nach der Methylierung von Menachinon hin. Durch den Austausch von Wasser gegen Deuteriumoxid bzw. Deuteriumoxid gegen Wasser ist ebenfalls zwischen der Reaktionszeit von 1 h und 24 h eine Veränderung des Spektrums zu beobachten (Abb. 74D und H). Im Falle des Austausches von Wasser gegen Deuteriumoxid, ist eine Abnahme des [MK₄-CH₃+H]⁺-Ions (459,3 *m/z*) nach 24 h zuerkennen, wodurch mehr [MK₄-CDH₂+H]⁺ (460,3 *m/z*) entsteht. Durch den Austausch von Deuteriumoxid gegen Wasser ist nach 24 h ein Shift des Basispeaks zu erkennen. Nach einer Stunde Reaktion besitzt der Basispeak eine Masse von 468,3 *m/z* und entspricht damit dem Molekül [MK₄-d₇-CH₃+H]⁺. Der Basispeak nach 24 h besitzt eine Masse von 467,3 *m/z* ([MK₄-d₇-CD₂H+H]⁺).

Zusammengefasst fällt in dem Experiment auf, dass in den Proben, in denen nur SAM deuteriert vorlag die transferierte Methylgruppe 2 D-Atome besitzt bzw. in den Proben, die mit natürlichem SAM die transferierte Methylgruppe 2 H-Atome. Dies ist ein klares Indiz für einen Transfer einer Methylengruppe anstelle einer Methylgruppe. Demnach stammt das dritte H-/D-Atom der Methylgruppe von 8-MMK₄ entweder vom C-8 des MK₄ oder aus dem Puffer.

In den vier Proben, in denen das MK₄ und der Puffer unterschiedlich markierten Spezies angehören (Abb. 74C, D, G und H), fällt auf, dass sich nach 1 Stunde Reaktionszeit in 3 der 4 Fälle 8-MMK₄ als Hauptprodukt gebildet hat, welches an der Methylgruppe 2 H/D-Atome vom SAM und 1 H/D-Atom vom MK₄ besitzt. Nach 24 h verschiebt sich das Produktspektrum in allen 4 Fällen und eine häufigere Bildung des Produkts bei dem die Methylgruppe 2 H/D-Atome von SAM und 1 H/D-Atom aus dem Puffer besitzt wird beobachtet. Besonders deutlich zu erkennen ist diese Verschiebung bei den Ansätzen in denen SAM-d₃ eingesetzt wurde (Abb. 74G und H).

Da nach den Beobachtungen nicht die gesamte Methylgruppe von SAM übertragen wird, sondern nur eine -CH₂ Gruppe stellt sich die Frage, wo das andere Proton des SAMs verblieben ist. Eine Möglichkeit wäre, dass ein ähnlicher Mechanismus wie bei anderen Radikal SAM Methyltransferasen stattfindet. Bei RlmN bildet sich ein 5-Ado-Radikal, welches im Anschluss ein Elektron auf den eigentlichen Methylgruppendonator überträgt. Dabei wird ein Proton von der ursprünglichen Methylgruppe des SAMs abstrahiert, das sich letztlich im 5-Ado wiederfindet. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden sämtliche Proben aus Abbildung 74 zusätzlich mit der HPLC-ESI-MS Methode analysiert. In allen Proben, die unmarkiertes SAM als Substrat beinhalteten, wurde das [5-Ado+H]⁺ mit einer Masse von 252,1 *m/z*

(Erwartet: 252,1 m/z) identifiziert (nicht gezeigt). Alle Proben, die mit dem deuterierten SAM angesetzt wurden, wiesen ebenfalls ein Signal mit derselben RT wie $[5\text{-Ado}+\text{H}]^+$ auf (RT von 3,94 min), jedoch zeigt dieses eine Masse von 253,2 m/z und ist daher um eine Masseneinheit schwerer als das natürliche 5-Ado. Dies entspricht der Masse von einfach deuteriertem 5-Ado und bestätigt damit die Annahme, dass ein 5-Ado-Radikal entsteht und das AeMenK-His Protein folglich zu den radikalischen SAM Enzymen gehört.

10.9. Diskussion

10.9.1. Reaktionsmechanismus von AeMenK-His

Nach der erfolgreichen Reinigung des AeMenK-His Proteins und der Charakterisierung des $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrums sollte die Aktivität für dieses Protein gezeigt und die dabei entstehenden Produkte analysiert werden. Daher wurde ein modifizierter Assay ohne Liposomen genutzt (Abb. 64). Nach einer Reaktionszeit von 24 h konnte eine 8-MMK₄-Konzentration von 1,1 μM ermittelt werden. Ein Grund für diese niedrige Aktivität könnte der artifizielle Elektronendonator Dithionit sein. Aufgrund der geringen Aktivität ließen sich die entstandenen Produkte von SAM hier nicht nachweisen. Die Gruppe von He setzte für den Enzymtest mit dem radikalischen SAM-Protein BlsE das natürliche FldA/Fpr-Redoxsystem ein und konnte eine 1,6-fache Steigerung der Aktivität im Vergleich zu Dithionit als Elektronendonator zeigen (Feng *et al.*, 2013). Die für das FldA/Fpr-Redoxsystem benötigten Proteine wurden, wie in Kapitel 6.4.12 beschrieben, produziert und gereinigt. In Abbildung 67 wurde die Funktionalität des FldA/Fpr-Redoxsystems mit Pferdeherz-Cytochrom c als Elektronenakzeptor nachgewiesen. Durch die Verwendung des FldA/Fpr-Redoxsystems im Methylierungsassay von AeMenK-His ließ sich eine 20-fache Aktivitätssteigerung erzielen. Während der Analyse fiel auf, dass im genutzten SAM bereits SAH und MTA detektiert wurden (Abb. 68). Dies liegt an der Instabilität von SAM. Bei längerer fachgerechter Lagerung (-80 °C) oder bei höheren Temperaturen sowie einem pH-Wert von über pH 1,8 lagert sich SAM zu MTA oder SAH um (Wang *et al.*, 2018). Trotz der 20-fachen Aktivitätssteigerung konnte nach 24 h nur eine 8-MMK₄ Konzentration von $22,8 \mu\text{M} \pm 4,5 \mu\text{M}$ gemessen werden. Dies entspricht einem Umsatz des eingesetzten MK₄ von 20 %. Es ist zu vermuten, dass das bereits vorhandene MTA bzw. SAH die Aktivität des AeMenK-His einschränkt. So wirken SAH und 5-Ado für radikalische SAM Proteine wie BioB, LipA oder ThiH inhibitorisch (Challand *et al.*, 2009; Hutcheson & Broderick, 2012). Dementsprechend könnte die intrinsische SAH Konzentration ebenfalls für AeMenK-His inhibitorisch wirken. Um diese mögliche Inhibierung zu umgehen, müsste das SAM selbst hergestellt werden. Eine weitere Möglichkeit das SAH und auch das MTA im Enzymtest zu eliminieren wäre die Zugabe

der MTA/SAH-Nukleosidase (MTAN), welche das Adenin von 5-Ado, SAH und MTA abspaltet. SAM dagegen fungiert nicht als Substrat für die MTAN (Challand *et al.*, 2009). Jedoch wäre es bei der Zugabe von MTAN nicht möglich die Produkte 5-Ado, SAH und MTA zu quantifizieren. Daher wurde zur Bestimmung der Produkt-Stöchiometrie kein MTAN in der Reaktion eingesetzt.

Die zeitliche Analyse der Produkte SAH, 5-Ado, 8-MMK₄, MTA und t-Ado zeigt eindeutig einen stöchiometrischen Anstieg der Produkte SAH, 5-Ado und 8-MMK₄ mit einem Verhältnis von 1:1:1. Da sich die Konzentration von MTA über die Zeit nicht signifikant verändert und t-Ado nicht detektiert wurde, deutet dies auf die Bildung von einem SAH-Molekül und einem 5-Ado-Molekül pro Molekül 8-MMK₄ bei einem Umsatz von 2 SAM Molekülen pro MK₄ hin. Diese Stöchiometrie wurde ebenfalls für die Klasse C RSMTs TbtI und C10P beschrieben (Zhang *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2018). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gehört TbtI zu den am besten charakterisierten Klasse C RSMTs und katalysiert die Methylierung des Thiazolrings im Thiopeptid Thiomuracin (Zhang *et al.*, 2017). C10P ist essentiell für die Cyclopropanierung der Spirocyclopropylcyclohexadienone CC-1065 und Gilvusmycin (Jin *et al.*, 2018). Es zeigt dieselben Charakteristika im Reaktionsmechanismus wie TbtI und transferiert eine Methylgruppe an Position 11 des Substrates CC-1065. Das dritte charakterisierte Enzym der Klasse C RSMT ist das NosN (Yu *et al.*, 2009). Es methyliert eine Vorstufe des Nosiheptids am Kohlenstoffatom C-4. Für das NosN wurde jedoch zunächst eine Stöchiometrie von einem t-Ado Molekül und einem 5-Ado Molekül pro methyliertem Produkt beschrieben (Ding *et al.*, 2017a, b). Eine weitere Kontroverse zwischen dem postulierten Reaktionsmechanismus von NosN und dem von TbtI, ist das entstehende MTA in der Reaktion von NosN. Für NosN wurde beschrieben, dass MTA als direkter Methylgruppendonor fungiert und nicht SAM wie im Reaktionsmechanismus von TbtI und C10P. Ding *et al.* 2017a postulierten zudem die Bildung vom MTA aus SAM aufgrund einer anderen Radikalbildung am SAM durch das Eisen-Schwefel-Zentrum des NosN. Diese Bildung von MTA konnte für das AeMenK-His nicht beobachtet werden (Abb. 69B). Neueste Studien über den Reaktionsmechanismus von NosN zeigten ebenfalls, dass keine Zunahme oder Abnahme der MTA Konzentration oder der t-Ado Konzentration mit der Zeit erfolgte (Wang *et al.*, 2018). Zudem konnten Wang *et al.* (2018) zeigen, dass in einem Gemisch aus markiertem ¹³C-Methyl-SAM und MTA nur das markierte methylierte Produkt nachweisbar war, wodurch sie schlussfolgerten, dass SAM der direkte Methylgruppendonor ist und nicht das zuvor von Ding *et al.* (2017a) postulierte MTA. Basierend auf diesen Ergebnissen wird der folgende Reaktionsmechanismus für AeMenK-His postuliert (Abb.75).

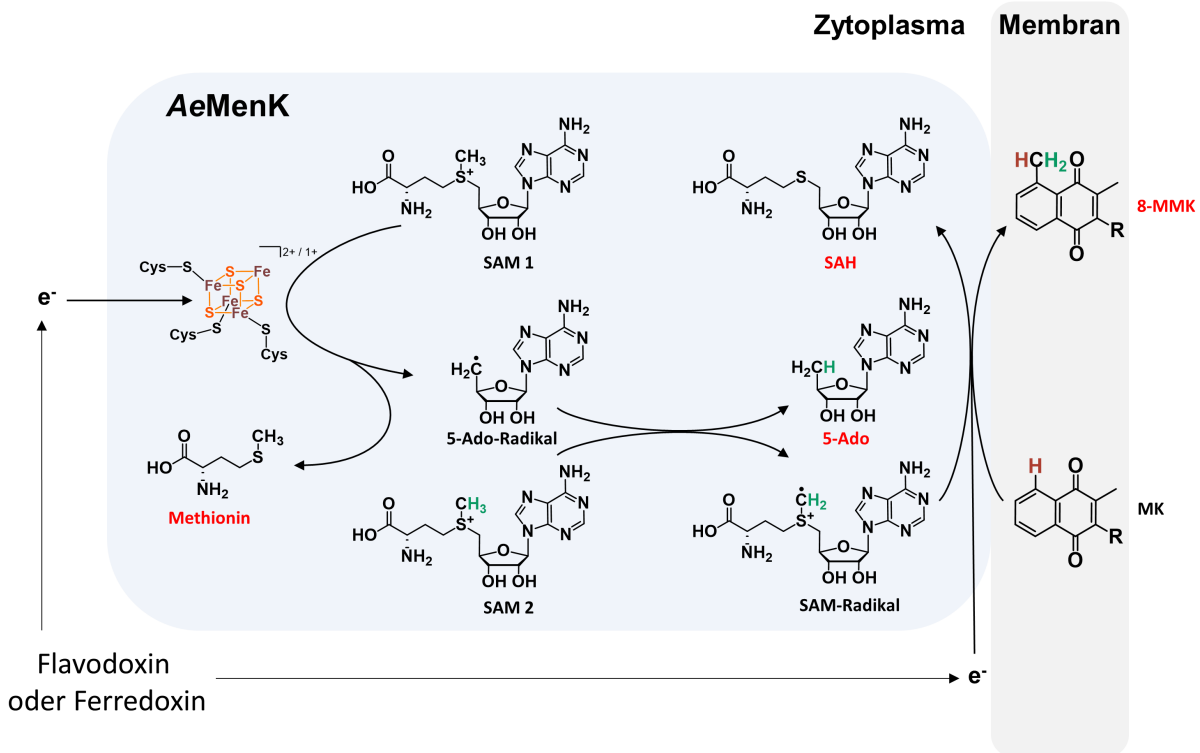


Abbildung 75 Reaktionsmechanismus der radikalischen SAM Menachinon-Methyltransferase AeMenK. MK: Menachinon, 8-MMK: 8-Methylmenachinon, SAM: S -Adenosyl- L -Methionin, SAH: S -Adenosylhomocystein, e^- : Elektron, 5-Ado: 5'-Desoxyadenosin. Rot: Entstehende Produkte.

In dem dargestellten Reaktionsmechanismus transferiert Flavodoxin oder Ferredoxin ein Elektron auf das [4Fe-4S]-Zentrum wodurch das Zentrum vom $2+$ Zustand in den $1+$ Zustand wechselt. Im $1+$ Zustand bindet das SAM 1 am [4Fe-4S]-Zentrum und ein 5-Ado-Radikal wird initiiert, wodurch Methionin als erstes Endprodukt der Reaktion abgespalten wird. Anschließend wird das Radikal auf SAM 2 übertragen, indem das 5-Ado-Radikal ein Proton vom SAM 2 abstrahiert. Zusammen mit einem weiteren Elektron überträgt das entstandene SAM-Radikal die Methylengruppe auf das C-8 Atom des Menachinons (MK). Im Vergleich zu den Klasse C RSMT, wird in der Klasse A die Methylgruppe vom SAM 2 zunächst auf einen Aminosäurerest des Enzyms übertragen bevor sich das Methylen-Radikal bildet (Bauerle *et al.*, 2015). Eine derartige Übertragung der Methylgruppe vom SAM 2 auf das Enzym kann für MenK nicht ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten Zhang *et al.* (2017), nach der Inkubation von TbtI mit ^{14}C -radioaktiv-markiertem SAM, dass das TbtI nicht radioaktiv war und postulierten für die Klasse C RSMT keine Übertragung der Methylgruppe von SAM 2 auf das Enzym.

Im Reaktionsmechanismus (Abb. 75) ist dargestellt, dass sich das Proton des C-8 Atoms des MK nach Methylierung an der Methylgruppe des 8-MMK befindet. Diese These wurde aufgestellt, da für die Klasse C RSMT postuliert wurde, dass eines der drei Protonen der Methylgruppe das Proton ist, welches sich zuvor am Kohlenstoffatom des Methylgruppenakzeptors befand. Um diesen Sachverhalt für AeMenK zu prüfen, wurde der Enzymtest mit Deuterium-markierten Substraten (SAM-d₃, MK₄-d₇ und deuteriertem Puffer) durchgeführt (Kap. 10.8). Durch den Einsatz der deuterierten bzw. natürlichen Substraten in allen möglichen Kombinationen lassen sich einzelne Protonen während der Reaktion verfolgen. So besitzt das 5-Ado in jedem Test, der mit deuteriertem SAM durchgeführt wurde, eine Masse von 252,1 *m/z* und nicht die übliche Masse von 251,1 *m/z* wie beim natürlichen SAM. Dies deutet auf die besagte Abstraktion eines Protons von der übertragenden Methylgruppe des SAM 2 auf das 5-Ado hin. Das Isotopenmuster des entstandenen 8-MMK₄ wurde für alle Kombinationen nach einer Assayinkubationszeit von 1 h bzw. 24 h dargestellt (Abb. 74). Für die Kombinationen, die nur deuterierte oder natürliche Substrate im Assay beinhalteten, wurde keine Verschiebung des Isotopenmusters im Zeitraum zwischen 1 h und 24 h beobachtet, und das Hauptprodukt wurde entweder als 8-MMK₄ oder 8-MMK₄-d₉ identifiziert. Ebenso zeigten die Enzymtests in Abbildung 74B und F, bei denen das SAM von anderer Spezies ist als MK₄ und der Puffer, eine geringfügige Änderung des Isotopenmusters nach 24 h. Die übertragene Methylgruppe trägt zwei Protonen, die vom eingesetzten SAM stammen, während das dritte Proton demnach vom MK₄ oder aus dem Puffer stammt. Versuche mit Deuterium-markiertem SAM zeigten für die Enzyme TptI und NosN ebenfalls eine Abstraktion eines Deuteriums der Methylgruppe des zweiten SAM und den Transfer einer Methylengruppe (Zhang *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2017a). Das abstrahierte Deuterium wurde in beiden Studien am 5-Ado wiedergefunden. Sofern nur das SAM markiert vorlag, fanden beide Studien eine –CD₂H Gruppe am Substrat. Bei den letzten vier möglichen Kombinationen der Experimente mit AeMenK (Abb. 74C,D,G und H), war entweder das MK₄ deuteriert oder der Puffer. Bei allen diesen Kombinationen ist zunächst zu erkennen, dass 2 Protonen der transferierten Methylgruppe von der Methylgruppe des SAMs stammen und das dritte vom Puffer oder vom MK₄ stammen muss. Dabei ist in allen vier MS-Spektren zu erkennen, dass sich das Isotopenmuster des 8-MMK₄ im Zeitraum zwischen 1 h und 24 h änderte und der Anteil des 8-MMK₄, welches an der Methylgruppe das Wasserstoffatom des Kohlenstoffatoms C-8 des MK₄ besitzt, weniger wird. Der Anteil des 8-MMK₄ mit einem Proton des Puffers steigt dagegen. Die Tatsache, dass sich nach 1 h vermehrt das Produkt mit dem Wasserstoffatom des MK₄ bildet, deutet darauf hin, dass während des Transfers der Methylgruppe eine Abstraktion des Protons am C-Atom 8 durch eine Base z.B. in Form einer Aminosäure des AeMenK Proteins erfolgt.

Dieses Proton wird nach der Übertragung der $-\text{CH}_2$ Gruppe von SAM auf die Methylengruppe zurücktransferiert, wodurch die Methylgruppe des MMK entsteht. Nach 24 h sinkt der Anteil des 8-MMK₄ mit dem ursprünglichen Proton, was daher nahelegt, dass die Übertragung des Protons reversibel ist und die Base mit dem Lösungsmittel wechselwirken kann, wodurch sich mit der Zeit das Produkt mit dem Proton aus dem Puffer anreichern kann. Zhang *et al.* (2017) führten ein Experiment mit dem Enzym TptI, seinem Substrat (TbtA Hexazol Kern-Peptid) und deuteriertem SAM durch und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden in wässrigem Puffer, zeigte sich im Vergleich zum Reaktionsansatz nach 1 Stunde eine Verschiebung im Massenspektrum. Es stellte sich heraus, dass sich über die Zeit die Methylgruppe von $-\text{CD}_2\text{H}$ zu $-\text{CDH}_2$ änderte. Zur Verifikation isolierten Zhang und Kollegen (2017) das methylierte Substrat, welches eine $-\text{CD}_2\text{H}$ Methylgruppe trug und inkubierten dieses methylierte Substrat mit dem Enzym TptI für 16 h in wässrigem Puffer. Die anschließende Analyse zeigte, dass sich neben dem ursprünglichen Produkt mit der $-\text{CD}_2\text{H}$ Gruppe zusätzlich Produkte mit einer $-\text{CDH}_2$ Gruppe und sogar einer $-\text{CH}_3$ Gruppe im Ansatz befand. Dieses Experiment belegt, dass die Protonen der Methylgruppe durch das Enzym gegen Protonen des Puffers ausgetauscht werden können. Für AeMenK-His sollte das entsprechende Experiment mit der erneuten Exposition des methylierten Produkts in Zukunft noch durchgeführt werden. Dennoch zeigten sich erste starke Indizien des Protonenaustausches. Durch diese Erkenntnisse, lässt sich der Reaktionsmechanismus für die Übertragung der Methylengruppe vom SAM-Radikal auf das MK konkretisieren (Abb. 76).

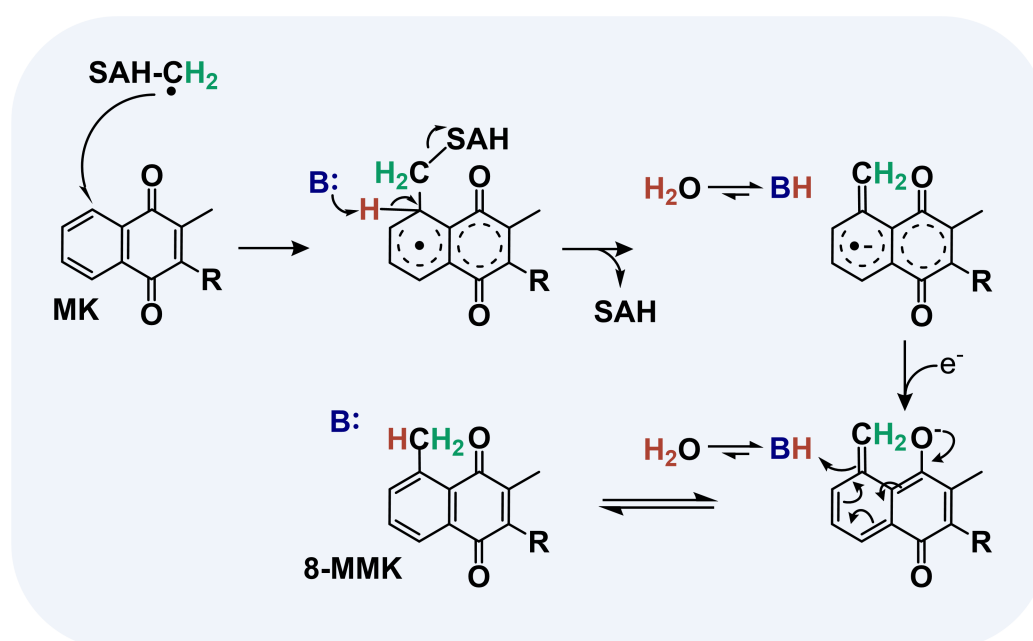


Abbildung 76 Übertragung der Methylengruppe vom SAM-Radikal auf Menachinon. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. B:, Basische Aminosäure, R: Isoprenoid-Seitenkette.

Für die Übertragung der Methylengruppe greift das SAM-Methylen-Radikal das Menachinon an Position C-8 an, wodurch das Radikal im aromatischen System des Menachinons stabilisiert werden kann. Das Proton an C-8 wird durch eine Base (vermutlich ein Aminosäurerest des MenK-Proteins) abstrahiert. Dadurch wird SAH abgespalten. Die Base kann mit Wasser wechselwirken, wodurch das Proton ausgetauscht werden kann. Durch ein weiteres Elektron von Flavodoxin oder Ferredoxin wird das Radikal neutralisiert und eines der Sauerstoffatome des Chinonsystems negativ geladen. Im letzten Schritt wird das Proton, das durch die Base abstrahiert wurde, auf das methylierte Menachinon übertragen, wodurch das Molekül seine eigentliche Struktur bekommt. Dieser Schritt ist vermutlich reversibel und ermöglicht einen Austausch der Protonen zwischen der Methylgruppe und dem Lösungsmittel.

Durch den Sequenzabgleich der Klasse C RSMTs wird ersichtlich, dass alle Methyltransferasen einen konservierten Aspartatrest besitzen. Im Falle des AeMenK Proteins ist dies die Aminosäure D188. Wie im Homologiemodell ersichtlich wird, befindet sich D188 in unmittelbarer Nähe der hypothetischen Menachinon-Bindestelle Y291 (Abb. 77).

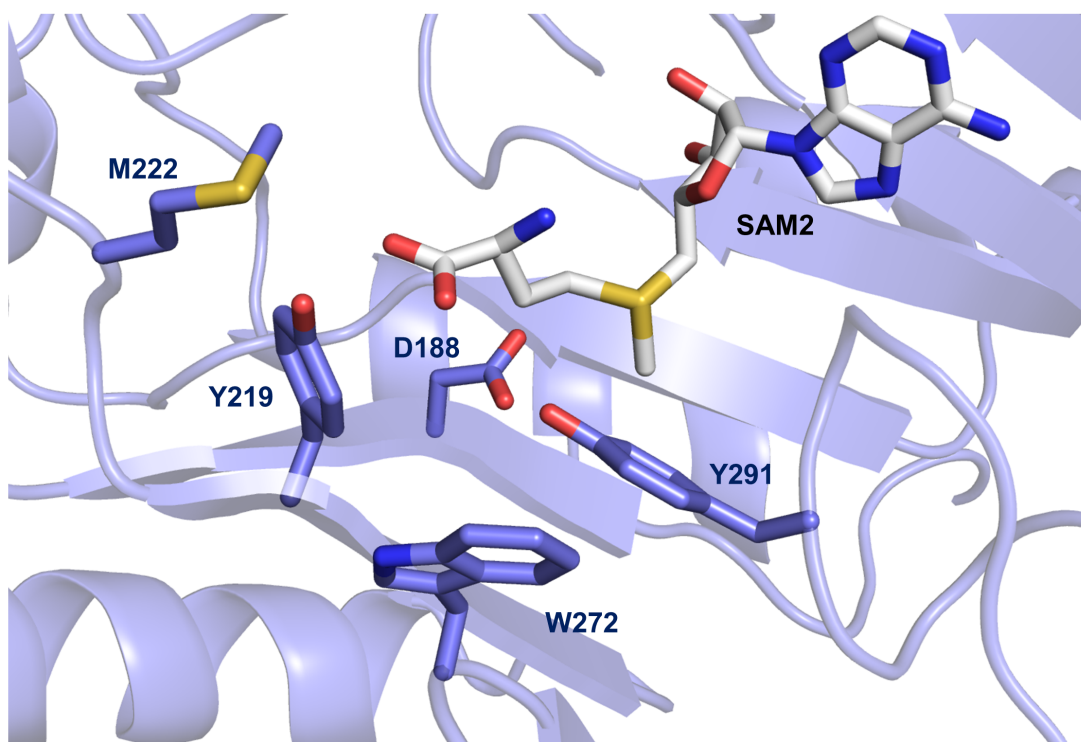


Abbildung 77 Homologiemodell von AeMenK mit der konservierten Aminosäure D188. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Das Modell wurde mit iTASSER (Zhang *et al.*, 2008) erstellt. Als Template wurde das HemN (PDB: 1OLT) genutzt.

Aufgrund der räumlichen Nähe des Aspartatrests D188, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um die vermeintliche Base handelt. In der Masterarbeit von Markus Polly wurde diese Aminosäure im Protein *WsMqnK* gegen Alanin ausgetauscht. Dieser Austausch führte offenbar *in vivo* zu einem komplett inaktiven Enzym, da kein 8-MMK₆ in den entsprechenden Zellkulturen von *W. succinogenes* mehr nachweisbar war. Dieser Austausch sollte im *AeMenK-His* Enzym ebenfalls durchgeführt werden. Nach der Reinigung der entsprechenden Variante sollte ein Enzymtest durchgeführt werden. Wäre die These korrekt, so dürfte der Austausch dafür sorgen, dass das Proton im Übergangszustand nicht mehr abstrahiert wird und der Übergangszustand länger erhalten bleibt. Da dieser radikalische Übergangszustand durchaus instabil ist, würde durch die Aufnahme eines Elektrons und eines Protons oder durch die Abgabe eines Elektrons dieser Zustand stabilisiert werden, was zur Folge hätte, dass sich die in Abbildung 78 gezeigten Nebenprodukte vermehrt akkumulieren.

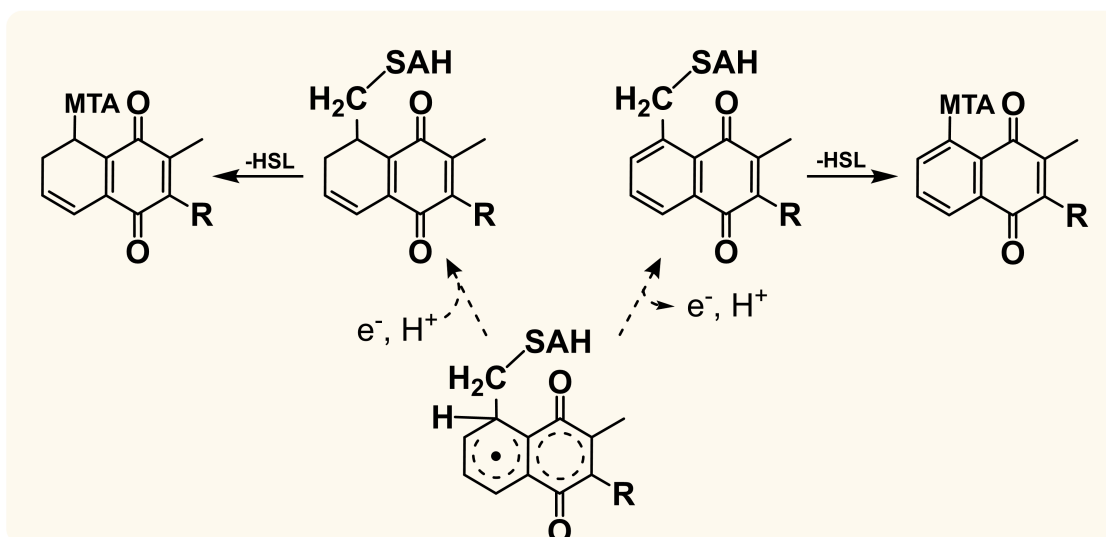


Abbildung 78 Bildung der hypothetischen Nebenprodukte aus dem MK-SAM-Radikal Intermediat.

Aus den aufgestellten Reaktionsmechanismen von C10P und NosN, wurde die Bildung der Nebenprodukte nachgewiesen, bei dem SAM oder MTA kovalent am Methylgruppenakzeptor gebunden ist (Ding et al., 2017a,b; Jin *et al.*, 2018). Im Falle von *AeMenK-His* würde sich für SAM-MK₄ eine Masse von 841,43 *m/z* und für MTA-MK₄ eine Masse von 739,377 *m/z* ergeben. Die Bildung dieser Nebenprodukte konnte bei der HPLC-ACI-HR-MS Messung nicht bestätigt werden (Abb. 71). Es fiel jedoch auf, dass neben dem Hauptsignal für 8-MMK₄ bei einer RT von 25,3 min im Bereich 22 min bis 24 min vermehrt die Masse von 8-MMK₄ gefunden wurde. Das Isotopenmuster dieses Signals zeigt jedoch nicht die Masse von [8-MMK₄+H]⁺ von 459,3 *m/z*, sondern eine Masse von 457,3 *m/z*. Die nähere Betrachtung ergab, dass es sich hier um ein Fragmentierungsprodukt von MTA-MK₄ handeln könnte, wobei die Abweichung von 0,222 *m/z*

bei der kalibrierten Messung jedoch zu hoch war (Abb. 71). Ein mögliches Fragmentierungsprodukt von SAM-MK₄ konnte nicht identifiziert werden, dies könnte jedoch daran liegen, dass als Ionisierungsmethode die APCI genutzt wurde. Bei der APCI werden Temperaturen von mehr als 350 °C benötigt. Bei diesen Temperaturen zerfällt SAM in MTA durch Abspaltung von HSL (Ohashi *et al.*, 2017), wodurch immer nur das Produkt MTA-MK₄ zu finden wäre.

Weiterhin postulierten Ding *et al.* (2017a,b) die Umsetzung von t-Ado mit Homoserinlacton (HSL) zu SAH. Die Produktion von SAH aus t-Ado und HSL konnte für das AeMenK-His nicht gezeigt werden. Stattdessen wurde ein Produkt mit der Masse von SAH (385,4 m/z) bei einer Retentionszeit von 3,94 min detektiert (Abb. 70). Aufgrund dieser Abweichung (RT von SAH: 3,26 min) wurde die Bildung von SAH nicht bestätigt. Bei der Betrachtung beider möglichen Reaktionsmechanismen der nukleophilen Laktonring-Öffnung ist in Abb. 79 zu erkennen, dass neben der Bildung von SAH auch die Bildung von S-(5'-Adenosyl)-Thiohomoserin (SAHs) möglich wäre. Beide Moleküle besitzen dieselbe Summenformel und dasselbe Molekulargewicht und können daher nicht mittels Massenspektrometrie unterschieden werden (Abb. 79).

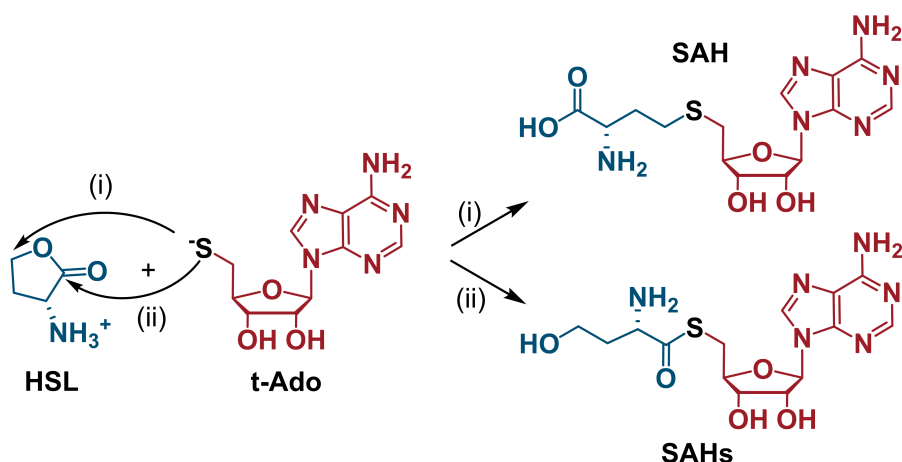


Abbildung 79 Nukleophile Laktonringöffnung von HSL durch t-Ado. (i), Nukleophiler Angriff der Thiogruppe vom t-Ado am γ-Kohlenstoffatom. (ii), Nukleophiler Angriff der Thiogruppe vom t-Ado am Carbonyl-Kohlenstoffatom.

Beim Vergleich der Strukturen von SAH und SAHs fällt auf, dass SAH eine Carboxylgruppe besitzt, während SAHs an der Position lediglich eine Hydroxylgruppe trägt. Dieser Unterschied macht das Molekül SAH hydrophiler, wodurch es bei der verwendeten RP-HPLC eine kürzere Retentionszeit aufweisen sollte als SAHs. Da das in Abbildung 70 identifizierte Produkt eine um 0,3 min längere Retentionszeit aufweist als SAH, liegt hier die Vermutung nahe, dass es sich hier um SAHs handelt. Demnach wurde eine Umsetzung von t-Ado und HSL durch AeMenK-His ausgeschlossen.

11. Fazit und Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse beweisen die Funktion von MqnK/MenK und MenK2 als Menachinon-Methyltransferasen. Dabei ist anzumerken, dass der aufgestellte Reaktionsmechanismus von AeMenK und die publizierten Reaktionsmechanismen von TbtI, NosN und C10P die Grundlage für eine Umbenennung dieser Enzymfamilie bieten. All diese Enzyme transferieren nicht die gesamte Methylgruppe des SAMs auf den Methylgruppenakzeptor, sondern lediglich ein Methylenradikal. Klassische Methyltransferasen dagegen transferieren die gesamte Methylgruppe über einen S_N2-ähnlichen Reaktionsmechanismus auf das Zielmolekül (O'Hagan & Schmidberger, 2009). Daher wäre die Überlegung angebracht diese Enzyme Methylasen und nicht Methyltransferasen zu nennen.

In Zukunft ist es mithilfe der identifizierten konservierten Motive QTTFYPLM für MenK/MqnK und QTTFSPY für MenK2 möglich, diese Proteine von ähnlichen Methyltransferasen oder HemN-ähnlichen Proteinen zu unterscheiden. Dies bringt die Möglichkeit mit sich die Gene dieser Proteine als Marker zu nutzen, um vorherzusagen, ob ein Organismus in der Lage ist Methylmenachinon oder Dimethylmenachinon zu produzieren. Daraus lassen sich wiederum Hypothesen über dessen Energiestoffwechsel treffen. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit das Protein AeMenK-His erfolgreich produziert, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Es wurden Indizien für den Austausch der Protonen der Methylgruppe über eine Aminosäure gefunden, wobei als Kandidat der Aspartatrest D188 vorgeschlagen wurde. Zur Bestätigung müssten hier Aminosäureaustausche durchgeführt werden und die entstandenen Proteinvarianten anschließend auf mögliche Nebenprodukte der Methylierungsreaktion untersucht werden. Auch das beschriebene Y291, welches womöglich an der Ausbildung der Menachinon-Bindestelle beteiligt ist, sollte ausgetauscht und näher charakterisiert werden. Zur endgültigen Bestätigung der Chinon-Bindestelle und der dargestellten Modelle sollte die Kristallstruktur von AeMenK ermittelt werden. Auch die Funktion von DMMK, welches offenbar nur in Angehörigen der Coriobacteriia zu finden ist, ist bis dato unklar. Denkbar wäre eine Beteiligung an den Elektronentransportketten dieser Organismen. Ein Indiz dafür ist große Anzahl an Genen für membrangebundene Molybdoenzyme-Komplexe des DMSO-Reduktase-Typs in den Genomen verschiedener Spezies der Coriobacteriia (Rothery & Weiner, 2015). So werden allein 17 Membrananker des PsrC/NrfD-Typs in *A. equolifaciens* kodiert (Hein *et al.*, 2018). Da keines dieser Proteine in einem Vertreter der Coriobacteriia näher untersucht ist, ist die Vorhersage der Chinonspezifität und der Bedeutung von DMMK und MMK in diesen Organismen nicht möglich. Um die Funktion von DMMK und MMK in den Coriobacteriia zu verstehen, wäre die Erstellung von Deletionsmutanten und die Entwicklung eines genetischen Systems für diese Organismen hilfreich. Neben der Bedeutung

von methylierten Menachinonen in den Elektronentransportketten, ist es denkbar, dass methylierte Menachinone eine Schutzfunktion gegen Antibiotika wie Lysocin E bieten. Lysocin E ist ein zyklisches Peptid und wird von Bakterien der Gattung *Lysobacter* produziert (Hamamoto *et al.*, 2015). Es wurde gezeigt, dass Lysocin E selektiv Menachinon bindet und antibakteriell gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und weitere Menachinon-produzierende Bakterien wirkt. Da die Autoren keinen Methylmenachinon- oder Dimethylmenachinon-produzierenden Organismus getestet haben besteht die These, dass Lysocin E durch die strukturelle Änderung des Menachinons nach der Methylierung durch MenK und/oder MenK2 das Menachinon nicht mehr binden kann und gegen diese Mikroorganismen nicht wirksam ist.

Des Weiteren sollte AeMenK2 ebenfalls biochemisch charakterisiert werden. Dieses konnte zwar bereits erfolgreich mithilfe der His-Tag-Technologie gereinigt und *in vitro* eine C-7-Methylierung des MK₄ nachgewiesen werden (Sascha Hein, nicht veröffentlicht), jedoch sollte das [4Fe-4S]-Zentrum und die Produktstöchiometrie analysiert werden. Zudem sollte getestet werden, ob AeMenK und AeMenK2 auch Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon; Vitamin K₃) als Substrat nutzen und 8-Methylmenadion bzw. 7-Methylmenadion produzieren können. Sofern dies der Fall wäre, hätte AeMenK2 ein biotechnologisches Potential. 7-Methylmenadion (auch Chimaphilin genannt) wird von einigen Pflanzen wie z.B. dem Dolden-Winterlieb (*Chimaphila umbellata*) gebildet und besitzt sowohl eine antibiotische als auch eine anticancerogene Wirkung (Saxena *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2014). Die Biosynthese von Chimaphilin ist wie die vieler nichtprenylierter Naphthochinone in Pflanzen bis dato unklar, sodass Chimaphilin zurzeit mithilfe chemischer Verfahren produziert wird (Widhalm & Rhodes, 2016). Eine weitere Anwendung könnten MenK/MqnK und MenK2 im „Chinonpool-Engineering“ finden. Sind zukünftig für einen biotechnologischen Prozess Elektronen mit einem negativeren Redoxpotential als das des Menachinons ($E_0' = -70$ mV) nötig, werden diese Prozesse durch die Anwesenheit eines methylierten Chinons ermöglicht, so wie z.B. die Polysulfid-Atmung erst durch 8-MMK ermöglicht wird.

12. Literaturverzeichnis

- Akagawa-Matsushita, M., Itoh, T., Katayama, Y., Kuraishi, H., and Yamasato, K. (1992) Isoprenoid quinone composition of some marine *Alteromonas*, *Marinomonas*, *Deleya*, *Pseudomonas* and *Shewanella* species. *J Gen Microbiol*, **138**: 2275–2281.
- Allen, K.D., Xu, H., White, H. (2014) Identification of a unique radical *S*-adenosylmethionine methylase likely involved in methanopterin biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*. *J Bact*, **196**: 3315–3323.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, **2**.
- Bauerle, M.R., Schwalm, E.L., and Booker, S.J. (2015) Mechanistic diversity of radical *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. *J Biol Chem*, **290**: 3995–4002.
- Beg, Q.K., Zampieri, M., Kiltgord, N., Collins, S.B., Altafini, C., Serres, M.H., Segrè, D. (2012) Detection of transcriptional triggers in the dynamics of microbial growth: application to the respiratorily versatile bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nucleic Acids Research*, **40**: 7132–7149.
- Bergmeyer, H. U. (1974) Methoden der enzymatischen analyse. Verlag Chemie.
- Broderick, J.B., Duffus, B.R., Duschene, K.S., Shepard, E.M. (2014) Radical *S*-adenosylmethionine enzymes. *Chem Rev*, **114**: 4229–4317.
- Bokranz, M., Katz, J., Schröder, I., Robertson, A.M., Kröger, A. (1983) Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor. *Arch Microbiol*, **135**: 36–41.
- Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Jimenez, F., and Guinea, J. (2002) *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**: 195–205.
- Bozal, N., Montes, M.J., Minana-Galbis, D., Manresa, A., and Mercadé, E. (2009) *Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 336–340.
- Cantoni, G.L. (1975) Biological methylation: Selected aspects. *Annu Rev Biochem*, **44**: 435–51.
- Challand, M. R., Ziegert, T., Douglas, P., Wood, R. J., Kriek, M., Shaw, N. M., & Roach, P. L. (2009) Product inhibition in the radical *S*-adenosylmethionine family. *FEBS Lett*, **583**: 1358-1362.
- Carlone, G.M., and Anet, F.A. (1983) Detection of menaquinone-6 and a novel methyl-substituted menaquinone-6 in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *J Gen Microbiol*, **129**: 3385–3393.

- Clavel, T., Charrier, C., Braune, A., Wenning, M., Blaut, M., and Haller, D. (2009) Isolation of bacteria from the ileal mucosa of TNF^{deltaARE} mice and description of *Enterorhabdus mucosicola* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 1805–1812.
- Clavel, T., Duck, W., Charrier, C., Wenning, M., Elson, C., and Haller, D. (2010) *Enterorhabdus caecimuris* sp. nov., a member of the family *Coriobacteriaceae* isolated from a mouse model of spontaneous colitis, and emended description of the genus *Enterorhabdus* Clavel et al. 2009. *Int J Syst Evol Microbiol*, **60**: 1527–1531.
- Clavel, T., Charrier, C., Wenning, M., and Haller, D. (2013) *Parvibacter caecicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family *Coriobacteriaceae* isolated from the caecum of a mouse. *Int J Syst Evol Microbiol*, **63**: 2642–2648.
- Collins, M.D., and Fernandez, F. (1984) Menaquinone-6 and thermoplasmaquinone-6 in *Wolinella succinogenes*. *FEMS Microbiol Lett*, **22**: 273–276.
- Collins, M.D. (1985) Structure of thermoplasmaquinone from *Thermoplasma acidophilum*. *FEMS Microbiol Lett*, **28**: 21–23.
- Collins, M.D., Fernandez, F., and Howarth, O.W. (1985) Isolation and characterization of a novel vitamin-K from *Eubacterium lentum*. *Biochem Biophys Res Comm*, **133**: 322–328.
- Collins, M.D., and Widdel, F. (1986) Respiratory quinones of sulphate-reducing and sulphur-reducing bacteria: a systematic investigation. *System Appl Microbiol*, **8**: 8–18.
- Collins, M.D., and Tindall, B.J. (1987) Occurrence of menaquinones and some novel methylated menaquinones in the alkaliphilic, extremely halophilic archaebacterium *Natronobacterium gregoryi*. *FEMS Microbiol Lett*, **43**: 307–312.
- Dairi, T. (2012) Menaquinone biosynthesis in microorganisms. *Methods Enzymol*, **515**: 107–122.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci*, **97**: 6640–6645.
- Dietrich, W., and Klimmek, O. (2002) The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur J Biochem*, **269**: 1086–1095.
- Ding, W., Li, Y., Zhao, J., Ji, X., Mo, T., Qianzhu, H., Tu, T., Deng, Z., Yu, Y., Chen, F., Zhang, Q. (2017) The catalytic mechanism of the class C radical S-adenosylmethionine methyltransferase NosN. *Angew Chem Int Ed Engl*, **56**: 3857–3861.
- Ding, W., Wu, Y., Ji, X., Qianzhu, H., Chen, F., Deng, Z., Chen, F. & Zhang, Q. (2017) Nucleoside-linked shunt products in the reaction catalyzed by the class C radical S-adenosylmethionine methyltransferase NosN. *Chem Commun (Camb)*, **53**: 5235–5238.

- Eller, J., Hein, S., & Simon, J. (2019) Significance of MccR, MccC, MccD, MccL and 8-methylmenaquinone in sulfite respiration of *Wolinella succinogenes*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1860**: 12-21.
- Elling, F.J., Becker, K.W., Könneke, M., Schröder, J.M., Kellermann, M.Y., Thomm, M., and Hinrichs, K.U. (2016) Respiratory quinones in *Archaea*: phylogenetic distribution and application as biomarkers in the marine environment. *Environ Microbiol*, **18**: 692–707.
- Farooqui, J., Kim, S., Paik, W.K. (1983) Measurement of isoelectric point of S-adenosyl-L-methionine and its metabolic products by an isoelectric focusing technique. *Electrophoresis*, **4**: 261–265.
- Feng, J., Wu, J., Dai, N., Lin, S., Xu, H. H., Deng, Z., & He, X. (2013) Discovery and characterization of BlsE, a radical S-adenosyl-L-methionine decarboxylase involved in the blasticidin S biosynthetic pathway. *PloS One*, **8**: e68545.
- Fernandez, F., & Collins, M.D. (1987) Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **41**: 175–180.
- Finster, K., Liesack, W., and Tindall, B.J. (1997) *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, **47**: 1212–1217.
- Fischer, D. S., & Price, D. C. (1964) A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridyl-s-triazine. *Clin Chem*, **10**: 21-31.
- Frolova, G.M., Pavel, K.G., Shparteeva, A.A., Nedashkovskaia, O.I., Gorshkova, N.M., Ivanova, E.P., and Mikhailov, V.V. (2005) Lipid composition of novel *Shewanella* species isolated from Far Eastern Seas. *Mikrobiologiya* **74**: 664–669.
- Francis, T.R., Becker, R.R. (1984) Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal Biochem*, **136**: 509–514.
- Grove, T. L., Benner, J. S., Radle, M. I., Ahlum, J. H., Landgraf, B. J., Krebs, C., Booker, S. J. (2011) A radically different mechanism for S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Science*, **332**: 604-607.
- Haase, D., Hermann, B., Einsle, O., & Simon, J. (2017) Epsilonproteobacterial hydroxylamine oxidoreductase (ϵ Hao): characterization of a ‘missing link’ in the multihaem cytochrome c family. *Mol Microbiol*, **105**:, 127-138.
- Hamamoto, H., Urai, M., Ishii, K., Yasukawa, J., Paudel, A., Murai, M., Kaji, M., Kuranaga, T., Hamase, K., Katsu, T., Su, J., Adachi, T., Uchida, R., Tomoda, H., Yamada, M., Souma, M., Kurihara, H., Inoue, M., & Sekimizu, K. (2015) Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. *Nat Chem Biol*, **11**: 127.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M., Stetter, K. O. (1999) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol Rev*, **22**: 353-381.

-
- Hein, S., Klimmek, O., Polly, M., Kern, M., & Simon, J. (2017) A class C radical S-adenosylmethionine methyltransferase synthesizes 8-methylmenaquinone. *Mol Microbiol*, **104**: 449-462.
- Hein, S., Witt, S., & Simon, J. (2017) Clade II nitrous oxide respiration of *Wolinella succinogenes* depends on the NosG,-C1,-C2,-H electron transport module, NosB and a Rieske/cytochrome *bc* complex. *Environ Microbiol*, **19**: 4913-4925.
- Hein, S., von Irmer, J., Gallei, M., Meusinger, R., & Simon, J. (2018) Two dedicated class C radical S-adenosylmethionine methyltransferases concertedly catalyse the synthesis of 7, 8-dimethylmenaquinone. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenerg*, **1859**: 300-308.
- Hermann, B., Kern, M., La Pietra, L., Simon, J., & Einsle, O. (2015) The octahaem MccA is a haem c-copper sulfite reductase. *Nature*, **520**: 706-709.
- Hiratsuka, T., Furihata, K., Ishikawa, J., Yamashita, H., Itoh, N., Seto, H., Dairi, T. (2008) An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science*, **321**: 1670-1673.
- Holliday, G. L., Akiva, E., Meng, E. C., Brown, S. D., Calhoun, S., Pieper, U., Sali, A., Booker, S.J. & Babbitt, P. C. (2018) Atlas of the radical SAM superfamily: Divergent evolution of function using a “Plug and Play” domain. *Methods Enzymol*, **606**: 1-71.
- Hu, Y., Ribbe, M. W. (2016) Maturation of nitrogenase cofactor—the role of a class E radical SAM methyltransferase NifB. *Curr Opin Chem Biol*, **31**: 188-194.
- Hutcheson, R. U., & Broderick, J. B. (2012) Radical SAM enzymes in methylation and methylthiolation. *Metallomics*, **4**: 1149-1154.
- Ishii, M., Omori, T., Igarashi, Y., Adachi, O., Ameyama, M., & Kodama, T. (1991) Methionaquinone is a direct natural electron acceptor for the membrane-bound hydrogenase in *Hydrogenobacter thermophilum* Strain TK-6. *Agric Biol Chem*, **55**: 3011-3016.
- Itoh, T., Funabashi, H., Katayama-Fujimura, Y., Iwasaki, S., and Kuraishi, H. (1985) Structure of methylmenaquinone-7 isolated from *Alteromonas putrefaciens* IAM 12079. *Biochim Biophys Acta*, **840**: 51–55.
- Ji, X., Mandalapu, D., Cheng, J., Ding, W., & Zhang, Q. (2018) Expanding the Chemistry of the class C radical SAM methyltransferase NosN by using an allyl analogue of SAM. *Angew Chem Int Ed Engl*, **130**: 6711-6714.
- Jin, J.-S., Lee, K.C., Park, I.S., Kim, K.K., Ahn, J.S., Benno, Y. *et al.* (2014) *Gordonibacter faecihominis* sp. nov., isolated from human faeces. *Antonie van Leeuwenhoek*, **106**: 439–447.
- Jin, W. B., Wu, S., Jian, X. H., Yuan, H., & Tang, G. L. (2018) A radical S-adenosyl-L-methionine enzyme and a methyltransferase catalyze cyclopropane formation in natural product biosynthesis. *Nat Commun*, **9**: 2771.

-
- Joshi, S., Fedoseyenko, D., Mahanta, N., Manion, H., Naseem, S., Dairi, T., Begley, T. P. (2018) Novel enzymology in futasine-dependent menaquinone biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, **47**: 134-141.
- Juhnke, H. D., Hiltcher, H., Nasiri, H. R., Schwalbe, H., & Lancaster, C. R. D. (2009) Production, characterization and determination of the real catalytic properties of the putative 'succinate dehydrogenase' from *Wolinella succinogenes*. *Mol Micro*, **71**: 1088-1101.
- Kern, M., Klotz, M.G., and Simon, J. (2011) The *Wolinella succinogenes* *mcc* gene cluster encodes an unconventional respiratory sulfite reduction system. *Mol Microbiol*, **82**: 1515–1530.
- Kern, M., and Simon, J. (2016) Three transcription regulators of the Nss family mediate the adaptive response induced by nitrate, nitric oxide or nitrous oxide in *Wolinella succinogenes*. *Environ Microbiol*, **18**: 2899–2912
- King, T. E., & Morris, R. O. (1967) Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. *Methods Enzymol*, **10**: 634-641.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G., and Lancaster, C.R.D. (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: Enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1553**: 23–38.
- Kühner, M., Schweyen, P., Hoffmann, M., Ramos, J. V., Reijerse, E. J., Lubitz, W., Bröring, M., & Layer, G. (2016) The auxiliary [4Fe–4S] cluster of the Radical SAM heme synthase from *Methanosarcina barkeri* is involved in electron transfer. *Chemical science*, **7**: 4633-4643.
- Kublik, A., Deobald, D., Hartwig, S., Schiffmann, C. L., Andrades, A., von Bergen, M., Adrian, L. (2016) Identification of a multi-protein reductive dehalogenase complex in *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB 1 suggests a protein-dependent respiratory electron transport chain obviating quinone involvement. *Environ Microbiol*, **18**: 3044-3056.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Layer, G., Verfürth, K., Mahlitz, E., Jahn, D. (2002) Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **277**: 34136-34142.
- Layer, G., Kervio, E., Morlock, G., Heinz, D. W., Jahn, D., Retey, J., Schubert, W. D. (2005) Structural and functional comparison of HemN to other radical SAM enzymes. *Biol Chem*, **386**: 971-980.

-
- Lorenzen, J., Steinwachs, S., & Uden, G. (1994) DMSO respiration by the anaerobic rumen bacterium *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol*, **162**: 277-281.
- Ma, W. D., Zou, Y. P., Wang, P., Yao, X. H., Sun, Y., Duan, M. H., Fu, Y.J. & Yu, B. (2014) Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. *Food Chem Toxicol*, **70**: 1-8.
- Magalon, A., Alberge, F. (2016) Distribution and dynamics of OXPHOS complexes in the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1857**: 198-213.
- Martínez-Cifuentes, M., Salazar, R., Ramírez-Rodríguez, O., Weiss-López, B., Araya-Maturana, R. (2017) Experimental and theoretical reduction potentials of some biologically active ortho-carbonyl para-quinones. *Molecules*, **22**: 577-587.
- Maruo, T., Sakamoto, M., Ito, C., Toda, T., and Benno, Y. (2008) *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eggerthella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**: 1221–1227.
- Mato, J., Alvarez, L., Ortiz, P., & Pajares, M. A. (1997) S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther*, **73**: 265-280.
- Morotomi, M., Nagai, F., and Watanabe, Y. (2011) *Parasutterella secunda* sp. nov., isolated from human faeces and proposal of *Sutterellaceae* fam. nov. in the order *Burkholderiales*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **61**: 637–643.
- Moss, C.W., Kai, A., Lambert, M.A., and Patton, C. (1984) Isoprenoid quinone content and cellular fatty acid composition of *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol*, **19**: 772–776.
- Moss, C.W., Lambert-Fair, M.A., Nicholson, M.A., and Guerrant, G.O. (1990) Isoprenoid quinones of *Campylobacter cryaerophila*, *C. cinaedi*, *C. fennelliae*, *C. hyointestinalis*, *C. pylori*, and "*C. upsaliensis*". *J Clin Microbiol*, **28**: 395–397.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1993) Role of menaquinone in the reduction of fumarate, nitrate, iron (III) and manganese (IV) by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS Microbiol Lett*, **114**: 215-222.
- Nagai, F., Morotomi, M., Sakon, H., and Tanaka, R. (2009) *Parasutterella excrementihominis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Alcaligenaceae* isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 1793–1797.
- Nandi, N., Bera, T., Kumar, S., Purkait, B., Kumar, A., and Das, P. (2011) Involvement of thermoplasmaquinone-7 in transplasma membrane electron transport of *Entamoeba histolytica* trophozoites: a key molecule for future rational chemotherapeutic drug designing. *J Bioenerg Biomembr*, **43**: 203–215.
- Nishida, F., Nishijima, M., Mochida, K., Sano, H., Nomura, N., Sako, Y., & Maruyama, T. (1999) Isoprenoid quinones in an aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*. *FEMS Microbiol Lett*, **174**: 339-346.

-
- Nowicka, B., and Kruk, J. (2010) Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 1587–1605.
- O'Hagan, D., & Schmidberger, J. W. (2010) Enzymes that catalyse S_N2 reaction mechanisms. *Nat Prod Rep*, **27**: 900-918.
- Ohashi, M., Liu, F., Hai, Y., Chen, M., Tang, M. C., Yang, Z., Sato, M., Watanabe, K.N.H., & Tang, Y. (2017) SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis. *Nature*, **549**: 502-506.
- Pachmayr, F. (1961) Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen im Mineralwasser. (Dissertation).
- Polly, M. (2015) Untersuchungen zur bakteriellen Methylmenachinon-Synthese. (Masterarbeit).
- Quan, J., & Tian, J. (2011) Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nature protocols*, **6**: 242-251.
- Rettberg, L. A., Wilcoxon, J., Lee, C. C., Stiebritz, M. T., Tanifuji, K., Britt, R. D., Hu, Y. (2018) Probing the coordination and function of Fe₄-S₄ modules in nitrogenase assembly protein NifB. *Nature Commun*, **9**: 2824-2832.
- Rothery, R. A., & Weiner, J. H. (2015) Shifting the metallocentric molybdoenzyme paradigm: the importance of pyranopterin coordination. *J Biol Inorg Chem*, **20**: 349-372.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010) I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, **5**: 725-738.
- Saxena, G., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., & Towers, G. H. N. (1996) Chlorochimaphilin: a new antibiotic from *Moneses uniflora*. *J Nat Prod*, **59**: 62-65.
- Schmid, R., Goebel, F., Warnecke, A., & Labahn, A. (1999) Synthesis and redox potentials of methylated vitamin K derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **6**: 1199-1202.
- Schul, D.-N. (2015) Heterologe Produktion von Menachinon-Methyltransferasen in *Escherichia coli*. (Bachelorarbeit).
- Schoepp-Cothenet, B., Van Lis, R., Atteia, A., Baymann, F., Capowicz, L., Ducluzeau, A. L., Duval, S., ten Brink, F., Russell, M.J., & Nitschke, W. (2013) On the universal core of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1827**: 79-93.
- Sharma, P., Stagge, S., Bekker, M., Bettenbrock, K., Hellingwerf, K. J. (2013) Kinase activity of ArcB from *Escherichia coli* is subject to regulation by both ubiquinone and demethylmenaquinone. *PloS One*, **8**: e75412.
- Shimada, H., Shida, Y., Nemoto, N., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2001) Quinone profiles of *Thermoplasma acidophilum* HO-62. *J Bacteriol*, **183**: 1462–1465.

- Sikorski, J., Lapidus, A., Copeland, A., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Lucas, S. *et al.* (2010) Complete genome sequence of *Sulfurospirillum deleyianum* type strain (5175^T). *Stand Genomic Sci*, **2**: 149–157.
- Simon, J., Einsle, O., Kroneck, P. M., & Zumft, W. G. (2004) The unprecedented *nos* gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome *c* nitrous oxide reductase. *FEBS Lett*, **569**: 7-12.
- Soballe, R., Poolle, R. K. (1999) Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiol*, **145**: 1817-1830.
- Thurl, S., Buhrow, I., and Schäfer, W. (1985) Quinones from Archaeobacteria, I. New types of menaquinones from the thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *Biol Chem*, **366**: 1079–1083.
- Toffin, L., Bidault, A., Pignet, P., Tindall, B.J., Slobodkin, A., Kato, C., and Prieur, D. (2004) *Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**: 1943–1949.
- Uندن, G., & Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1320**: 217-234.
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., and Falsen, E. (2010) Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **60**: 2016–2022.
- Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J. *et al.* (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **49**: 705–724.
- Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Siever, S.M., Simon, J., Campbell, B.J., Hanson, E.H., Woyke, T., Klotz, M.G., Hugenholtz, P. (2018) Addendum: Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Front Microbiol*, **9**: 772.
- Wang, S. C., Frey, P. A. (2007) *S*-adenosylmethionine as an oxidant: The radical SAM superfamily. *Trends Biochem Sci*, **32**: 101-110.
- Wang, J., Woldring, R. P., Román-Meléndez, G. D., McClain, A. M., Alzua, B. R., Marsh, E. N. G. (2014) Recent advances in radical SAM enzymology: New structures and mechanisms. *ACS Chem Biol*, **9**: 1929-1938.
- Wang, Y., Chen, H., Liu, Z., Ming, H., Zhou, C., Zhu, X. *et al.* (2016) *Shewanella gelidii* sp. nov., isolated from red algae *Gelidium amansii* and emended description of *S. waksmanii*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **66**: 2899-2905.
- Wang, B., LaMattina, J. W., Badding, E. D., Gadsby, L. K., Grove, T. L., & Booker, S. J. (2018) Using peptide mimics to study the biosynthesis of the side-ring system of Nosiheptide. *Methods Enzymol*, **606**: 241-268.

-
- Widhalm, J. R., & Rhodes, D. (2016) Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic Res*, **3**: 16046.
- Wilkins, D. (2017) Substratspezifität der Menachinon-Methyltransferasen MenK und MenK2. (Masterarbeit).
- Wissenbach, U., Kröger, A., & Uden, G. (1990) The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, **154**: 60-66.
- Woodbury, N. W., Parson, W. W., Gunner, M. R., Prince, R. C., & Dutton, P. L. (1986) Radical-pair energetics and decay mechanisms in reaction centers containing anthraquinones, naphthoquinones or benzoquinones in place of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **851**: 6-22.
- Young, I. G. (1975) Biosynthesis of bacterial menaquinones. Menaquinone mutants of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **14**: 399-406.
- Yu, Y., Duan, L., Zhang, Q., Liao, R., Ding, Y., Pan, H., Wendt-Pienkowski, E., Tang, G., Shen, B. & Liu, W. (2009) Nosiheptide biosynthesis featuring a unique indole side ring formation on the characteristic thiopeptide framework. *ACS Chem Biol*, **4**: 855-864.
- Zhang, Z., Mahanta, N., Hudson, G. A., Mitchell, D. A., Van Der Donk, W. A. (2017) Mechanism of a class C radical S-adenosyl-L-methionine thiazole methyltransferase. *J Am Chem Soc*, **139**: 18623-18631.
- Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**: 40.
- Zhi, X. Y., Yao, J. C., Tang, S. K., Huang, Y., Li, H. W., & Li, W. J. (2014) The futasine pathway played an important role in menaquinone biosynthesis during early prokaryote evolution. *Genome Biol Evol*, **6**: 149-160.

13. Anhang

Tabelle 13 NMR-Shifts in ppm der charakterisierten Menachinone (In CDCl₃ relativ zu TMS = 0.0 ppm) und Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von DMMK.

C-Atom	MK ₆		8-MMK ₆		7-MMK ₆		7,8-DMMK ₆		8-MDMK ₈	
	¹³ C-Shift	¹ H-Shift	¹³ C-Shift	¹ H-Shift	¹³ C-Shift	¹ H-Shift	¹³ C-Shift	¹ H-Shift	¹³ C-Shift	¹ H-Shift
1	184,4	-	186,4	-	185,7	-	188,3	-	187,6	-
2	134,2	-	134,2	-	143	-	143,9	-	136,6	6,62
3	145,1	-	143,6	-	146	-	145,1	-	149,6	-
4	183,5	-	183,9	-	184,4	-	184,7	-	185,9	-
5	125,2	8,01	124,7	7,94	126,3	7,98	124,6	7,84	125,6	7,97
6	132,2	7,61	131,4	7,46	133,9	7,48	134,2	7,37	132,8	7,50
7	132,3	7,61	136,2	7,39	144,0	-	144,2	-	137,8	7,43
8	125,3	8,01	143,5	-	126,2	7,88	139,1	-	141,1	-
9	142,5	-	128,9	-	132,0	-	130,5	-	129,9	-
10	133,9	-	132,7	-	130,2	-	132	-	134,1	-
11	-	-	21,7	2,67	-	-	17,2	2,59	22,7	2,68
12	11,7	2,12	11,9	2,09	12,5	2,19	13,1	2,09	-	-
13	25,7	3,30	25,7	3,27	25,6	3,36	25,6	3,26	27,7	3,20
14	-	-	-	-	21,6	2,48	21,4	2,35	-	-

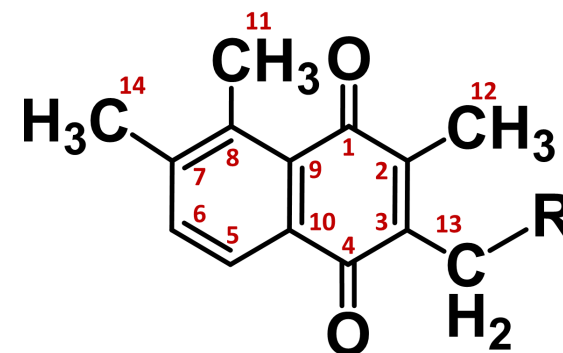


Tabelle 14 Zusammenstellung der MMK-produzierenden Organismen, deren MK-Biosyntheseweg und deren MqnK/MenK Proteine.

Organismus	Naphthochinone ¹	MK-Biosynthese ²	MqnK/MenK Kandidat ³	Referenzen
Phylum Actinobacteria, Klasse Coriobacteriia				
Ordnung Eggerthellales, Familie Eggerthellaceae				
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> DSM 19450	7,8-DMMK ₆ ; 8-MMK ₆	Men	BAN75994 (Aequ0025)	Maruo <i>et al.</i> , 2008, diese Arbeit
<i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243	MMK ₆ ; MK ₆	Men	ACV54031	Collins <i>et al.</i> , 1985; Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Eggerthella sinensis</i> DSM 16107	MMK ₆ , DMMK ₆ ; MK ₆	Unbekannt ⁴	Unbekannt ⁴	Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i> DSM 16106	MMK ₆ , DMMK ₆ ; MK ₆	Unbekannt ⁴	Unbekannt ⁴	Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>Enterorhabdus mucosicola</i> DSM 19490	MMK ₆	Men	WP_028027699	Clavel <i>et al.</i> , 2009
<i>Enterorhabdus caecimuris</i> B7	MMK ₆ , DMMK ₆	Men	EOS50322 (C811_01952)	Clavel <i>et al.</i> , 2010
<i>Gordonibacter pamelaiae</i> DSM 19378	MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆	Men	CBL03906 (GPA_12440)	Jin <i>et al.</i> , 2014
<i>Gordonibacter faecihominis</i> CAT-2	MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆	Unbekannt ⁴	Unbekannt ⁴	Jin <i>et al.</i> , 2014
Klasse Coriobacteriales, Familie Coriobacteriaceae				
<i>Parvibacter caecicola</i> NR06	MMK ₆ , DMMK ₆	Unbekannt ⁴	Unbekannt ⁴	Clavel <i>et al.</i> , 2013
Phylum Proteobacteria				
Klasse Betaproteobacteria, Ordnung Burkholderiales, Familie Sutterellaceae				
<i>Parasutterella excrementihominis</i> YIT 11859	MMK ₆ , MK ₆	Unbekannt	EGG57223	Nagai <i>et al.</i> , 2009
<i>Parasutterella secunda</i> YIT 12071	MMK ₅ , MK ₅	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Morotomi <i>et al.</i> , 2011
<i>Sutterella parvirubra</i> YIT 11816	MMK ₅	Unbekannt	WP_008543498	Morotomi <i>et al.</i> , 2011
<i>Sutterella stercoricanis</i> DSM 17807	MMK ₅ , MK ₅	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Morotomi <i>et al.</i> , 2011
<i>Sutterella wadsworthensis</i> DSM 14016	MMK ₅ , MK ₅	Unbekannt	WP_016475266	Morotomi <i>et al.</i> , 2011
Klasse Gammaproteobacteria, Ordnung Alteromonadales, Familie Shewanellaceae				
<i>Shewanella algae</i> JCM 21037	MK ₇ , MMK ₇	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Bozal <i>et al.</i> , 2002
<i>Shewanella baltica</i> OS 185	MMK ₇ , MK ₇	Men	WP_012090507	Bozal <i>et al.</i> , 2002
<i>Shewanella colwelliana</i> ATCC 39565	MK ₇ , MMK ₇	Men	WP_028763395	Frolova <i>et al.</i> , 2005
<i>Shewanella fidelis</i> ATCC BAA-318	MK ₇ , MMK ₇	Men	WP_028766718	Frolova <i>et al.</i> , 2005
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	MK ₇ , MMK ₇	Men	WP_011635568	Frolova <i>et al.</i> , 2005
<i>Shewanella gelidii</i> RZB5-4 ^T	MK ₇ , MMK ₇	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	MK ₇ , MMK ₇	Men	WP_011074137 (SO4520)	Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999; diese Arbeit
<i>Shewanella pacifica</i> KMM 3597 ^T	MK ₇ , MMK ₇	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Frolova <i>et al.</i> , 2005
<i>Shewanella profunda</i> DSM 157900 ^T	MMK ₇ , MK ₇ , MMK ₈ , MK ₈	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Toffin <i>et al.</i> , 2004
<i>Shewanella putrefaciens</i> IAM 12079	MK ₇ , 8-MMK ₇	Men	WP_011920063	Itoh <i>et al.</i> , 1985; Akagawa-Matsushita <i>et al.</i> , 1992
<i>Shewanella vesiculosa</i> M7 ^T	MK ₇ , MMK ₇	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Bozal <i>et al.</i> 2009

Tabelle 14 Zusammenstellung der MMK-produzierenden Organismen, deren MK-Biosyntheseweg und deren MqnK/MenK Proteine. (Fortsetzung)

Organismus	Naphthochinone ¹	MK-Biosynthese ²	MqnK/MenK Kandidat ³	Referenzen
Klasse Epsilonproteobacteria, Ordnung Campylobacterales				
Familie Campylobacteraceae				
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168	MK ₆ , MMK ₆	Mqn	CAL34513 (Cj0363c)	Carlone und Anet, 1983
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 82-40	MK ₆ , MMK ₆	Mqn	WP_010401553	Carlone und Anet, 1983
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> UM	MK ₆ ; MMK ₆ , MK ₅	Mqn	Unbekannt ⁴	Moss <i>et al.</i> , 1984
<i>Campylobacter curvus</i> DSM 6644	MMK ₆ , MK ₆	Mqn	WP_018137390	Fernandez und Collins, 1987
<i>Campylobacter rectus</i> RM 3267	MK ₆ , MMK ₆	Mqn	WP_002944906	Fernandez und Collins, 1987
<i>Campylobacter gracilis</i> RM 3268	MMK ₆ , MK ₆	Mqn	EEV18679	Fernandez und Collins, 1987
<i>Campylobacter coli</i> LMG 23344	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_002778274	Moss <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter lari</i> NCTC 11845	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_039627277	Moss <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter hyointestinales</i> subsp. <i>hyointestinales</i> DSM 19053	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_034961808	Moss <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter concisus</i> UNSWCD	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_004318049	Moss <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter mucosalis</i> DSM 21682	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_034968875	Moss <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter sputorum</i> INTA 08/209	MK ₆ ; MMK ₆ , MK ₅	Mqn	WP_033916250	Moss <i>et al.</i> , 1984
<i>Campylobacter upsaliensis</i> RM 3165	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_004275510	Moss <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter faecalis</i> sp. nov.	MK ₆ ; MMK ₆	Unbekannt	Unbekannt ⁴	Moss <i>et al.</i> , 1984
<i>Campylobacter ureolyticus</i> ACS-301-V-Sch3b	MK ₆ ; MMK ₆	Mqn	WP_016646478	Vandamme <i>et al.</i> , 2010
<i>Sulfurospirillum arcachonense</i> sp. nov.	MK ₆ , MMK ₆	Unbekannt	WP_037940449	Finster <i>et al.</i> , 1997
<i>Sulfurospirillum deleyianum</i> DSM 6946	MK ₆ , MMK ₆ , MK ₅	Mqn	WP_012856078	Sikorski <i>et al.</i> , 2010; Collins und Widdel, 1986
Familie Helicobacteraceae				
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	MK ₆ , 8-MMK ₆	Mqn	WP_011138079 (Ws0113)	Collins und Fernandez, 1984; diese Arbeit
Phylum Euryarchaeota				
Klasse Thermoplasmata, Ordnung Thermoplasmatales, Familie Thermoplasmataceae				
<i>Thermoplasma acidophilum</i> HO-62	8-MMK ₇ , MK ₇	Unbekannt	Nicht Identifiziert	Collins, 1985; Shimada <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermoplasma acidophilum</i> 122-1B2 ^T	MK ₇ , MMK ₇ , various MTKs	Unbekannt ⁴	Unbekannt ⁴	Elling <i>et al.</i> , 2016
Klasse Halobacteria, Ordnung Natrionalbales, Familie Natrionalbaceae				
<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP 2	MK ₈ , MK ₈ (VIII-H ₂), MMK ₈ , MMK ₈ (VIII-H ₂), DMMK ₈ , DMMK ₈ (VIII-H ₂)	Unbekannt	Nicht Identifiziert	Collins und Tindall, 1987

Tabelle 14 Zusammenstellung der MMK-produzierenden Organismen, deren MK-Biosyntheseweg und deren MqnK/MenK Proteine. (Fortsetzung)

Organismus	Naphthochinone ¹	MK-Biosynthese ²	MqnK/MenK Kandidat ³	Referenzen
Phylum Crenarchaeota, Klasse Thermoprotei				
Ordnung Desulfurococcales				
Familie Desulfurococcaceae				
<i>Ignicoccus hospitalis</i> KIN4/1 ^T <i>Aeropyrum pernix</i> K1 ^T	MMK ₆ , MK ₆ , MMK ₅ , MK ₅ , MK ₇ DMK ₆ , MK ₆ , DMK ₅ , MTK ₆ , MK ₅ , MMK ₅	Mqn Mqn	WP_011998375 Nicht Identifiziert	Elling <i>et al.</i> , 2016 Elling <i>et al.</i> , 2016
Familie Pyrodictiaceae				
<i>Pyrolobus fumarii</i> 1A ^T	MMK ₆ , MMK ₅ , MK ₆ , MK ₅ , MMK ₇	Mqn	WP_014025565	Elling <i>et al.</i> , 2016
Ordnung Thermoproteales, Familie Thermoproteaceae				
<i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1	MK ₆ , MK ₅ , MK ₄ , zwei Monomethylmenachinon Derivate	Mqn	WP_014126183	Thurl <i>et al.</i> , 1985
Reich Eukaryota				
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	MMK ₇	Unbekannt	Nicht Identifiziert	Nandi <i>et al.</i> , 2011

¹ Hauptchinon wird als erstes aufgeführt, sofern es beschrieben ist. Fett: Experimentelle Bestätigungen für die exakte Position der Methylgruppe am MMK. DMMK, Dimethylmenachinon; MTK, Methionachinon.

² Bestimmt von der Präsenz der Biosynthesegene MenD oder MqnC/MqnD. *E. coli* MenD und *S. coelicolor* MqnC/MqnD wurden als Templat genutzt.

³ GenBank Accession Nummer (Lokus-Tag).

⁴ Keine Genom Daten vorhanden.

Tabelle 15 In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen.

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
<i>W. succinogenes</i>		
1. Wildtyp	Stamm DSM 1740	DSMZ
2. <i>nosZ</i> ⁺	Derivat von 1; trägt ein intaktes <i>nosZ</i> Gen	Kern und Simon, 2016
3. <i>napA::cat</i>	Derivat von 1; Inaktivierung des <i>napA</i> Gens durch eine Insertion der <i>cat</i> Resistenzkassette; Cm ^R	Haase <i>et al.</i> , 2017
4. <i>napA::cat AeMenK2 kan</i>	Derivat von 3; trägt das <i>A. equolificaciens menK2</i> Gen im <i>nrf</i> -Gen Cluster; Km ^R ; Cm ^R	Diese Arbeit
5. <i>napA::cat ΔmqnK::apr</i>	Derivat von 3; mit deletiertem <i>mqnK</i> Gen; Cm ^R ; Apr ^R	Diese Arbeit
6. <i>napA::cat AeMenK2 kan ΔmqnK::apr</i>	Derivat von 3; mit deletiertem <i>mqnK</i> Gen; Cm ^R ; Km ^R ; Apr ^R	Diese Arbeit
7. <i>napA::cat AeMenK kan</i>	Derivat von 3; trägt das <i>A. equolificaciens menK</i> Gen im <i>nrf</i> -Gen Cluster; Km ^R ; Cm ^R	Diese Arbeit
8. <i>ΔmqnK::kan</i>	Derivat von 1; mit deletiertem <i>mqnK</i> Gen (Ws0113); Km ^R	Hein <i>et al.</i> , 2017
9. <i>ΔmqnK::kan</i> RecovrD-for-AeMenK-Strep cat	Derivat von 8; trägt das <i>A. equolificaciens menK</i> Gen in einem ribosomalen RNA Gen Cluster in Forward Orientierung; Km ^R ; Cm ^R	Diese Arbeit
10. <i>ΔmqnK::kan</i> RecovrD-for-AeMenK2-Strep cat	Derivat von 8; trägt das <i>A. equolificaciens menK2</i> Gen in einem ribosomalen RNA Gen Cluster in Forward Orientierung; Km ^R ; Cm ^R	Diese Arbeit
11. <i>ΔmqnK::kan</i> RecovrD-for- <i>mqnK</i> -Strep cat	Derivat von 8; das <i>WsmqnK</i> Gen wurde in einem ribosomalen RNA Gen Cluster in Forward Orientierung komplementiert; Km ^R ; Cm ^R	Diese Arbeit
12. <i>mccR</i> ⁺	Derivat von 1; Frameshift von <i>mccR</i> Gen wurde korrigiert und kodiert daher das intakte MccRS Regulation System; Cm ^R	Eller <i>et al.</i> , 2018
13. <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmqnK::kan</i>	Derivat von 12; mit deletiertem <i>mqnK</i> Gen (Ws0113); Km ^R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
1. XL-1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Agilent Technologies
2. BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (ΔDE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI ::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	
3. BL21(DE3) pET-AeMenK	Derivat von 2; trägt das Plasmid pET-AeMenK welches das C-terminal His-getaggte <i>A. equolificaciens</i> MenK kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
4. BL21(DE3) pET-FldA	Derivat von 2; trägt das Plasmid pET-AeMenK welches das C-terminal His-getaggte <i>E. coli</i> MG1655 FldA kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
5. BL21(DE3) pET-Fpr	Derivat von 2; trägt das Plasmid pET-AeMenK welches das C-terminal His-getaggte <i>E. coli</i> MG1655 Fpr kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
6. BL21(DE3) AeMenK	Derivat von 2; trägt das Plasmid pAC-AeMenK welches das C-terminal Strep-getaggte <i>A. equolificaciens</i> MenK kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
7. BL21(DE3) AeMenK2	Derivat von 2; trägt das Plasmid pAC-AeMenK2 welches das C-terminal Strep-getaggte <i>A. equolificaciens</i> MenK2 kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
8. BL21(DE3) WsMqnK	Derivat von 2; trägt das Plasmid pAC-WsMqnK welches das C-terminal Strep-getaggte <i>W. succinogenes</i> MqnK kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
9. BL21(DE3) Chim1	Derivat von 2; trägt das Plasmid pAC-Chim1 welches das C-terminal Strep-getaggte MenK2/MenK hybrid Protein Chim1 kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit

Tabelle 15 In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
10. BL21(DE3) Chim2	Derivat von 2; trägt das Plasmid pAC-Chim2 welches das C-terminal Strep-getaggte MenK2/MenK hybrid Protein Chim2 kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
11. BL21(DE3) Chim3	Derivat von 2; trägt das Plasmid pAC-Chim3 welches das C-terminal Strep-getaggte MenK2/MenK hybrid Protein Chim3 kodiert; Cm ^R	Diese Arbeit
12. BW25113	Parentaler Stamm für die Keio Einzelgen Knockout Sammlung [<i>lacI</i> ⁺ <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR</i> 514 Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} <i>rph</i> -1 Δ (<i>araB-D</i>)567 Δ (<i>rhaD-B</i>)568 Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3) <i>hsdR</i> 514 <i>rph</i> -1]	Datsenko und Wanner, 2000
13. JW5581	Derivat von 12; mit deletiertem <i>ubiE</i> Gen	Keio collection
14. BW25113 pSo-menK-Strep	Derivat von 12; trägt das Plasmid pSo-menK-Strep welches das C-terminal Strep-getaggte <i>S. oneidensis</i> MenK (SO4520) kodiert; Amp ^R	Diese Arbeit
15. BW25113 pAe-menK-Strep	Derivat von 12; trägt das Plasmid pAe-menK-Strep welches das C-terminal Strep-getaggte <i>A. equolificaciens</i> MenK (Aequ0025) kodiert; Amp ^R	Diese Arbeit
16. JW5581 pSo-menK-Strep	Derivat von 13; trägt das Plasmid pSo-menK-Strep welches das C-terminal Strep-getaggte <i>S. oneidensis</i> MenK (SO4520) kodiert; Amp ^R	Diese Arbeit
17. JW5581 pAe-menK-Strep	Derivat von 13; trägt das Plasmid pAe-menK-Strep welches das C-terminal Strep-getaggte <i>A. equolificaciens</i> MenK (Aequ0025) kodiert; Amp ^R	Diese Arbeit
18. XL-1 Blue pMBP-Ae-menK	Derivat von 1; trägt das Plasmid pMBP-Ae-menK welches das N-Terminal MBP-getaggte <i>A. equolificaciens</i> MenK (Aequ0025) kodiert; Amp ^R	Diese Arbeit
19. <i>E. coli</i> XL-1 Blue pWs-mqnK-Strep	Derivat von 1; trägt das Plasmid pWs-menK-Strep welches das C-terminal Strep-getaggte <i>WsMqnK</i> kodiert; Amp ^R	Diese Arbeit
<i>A. equolificaciens</i>		
1. Wildtyp	Stamm DSM 19450	DSMZ, Maruo <i>et al.</i> , 2008
<i>S. oneidensis</i>		
1. MR-1	ATCC 700550	ATCC, Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 16 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Nr.	Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
1	pPR-IBA3	AHT induzierbarer Expressionsvektor; Amp ^R	IBA Lifesciences
2	pΔmqnK	Deletionsplasmid zur Erstellung der <i>mqnK</i> Mutante; Kan ^R	Hein <i>et al.</i> , 2017
3	pΔmqnK apr	Deletionsplasmid zur Erstellung der <i>mqnK</i> Mutante; Apr ^R	Diese Arbeit
4	pRecovrD-for	Vektor zur Integration in eines der drei ribosomalen Gen-Cluster von <i>W. succinogenes</i> ; Cm ^R	Kern und Simon, 2015
5	pRCD- <i>mqnK</i>	Derivat von 4, zur Komplementation von <i>mqnK</i> in <i>W. succinogenes</i> ; Cm ^R	M. Polly; Masterthesis 2014
6	pWs-mqnK-Strep	Derivat von 1; zur Produktion von MqnK in <i>E. coli</i> XL-Blue; Amp ^R	M. Polly; Masterthesis 2014
7	pAC-WsMqnK	Derivat von 18; zur Produktion von MqnK in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Cm ^R	D. Wilkens; Masterthesis 2018
8	pSo-MenK-Strep	Derivat von 1; zur Produktion von SoMenK in <i>E. coli</i> XL-Blue; Amp ^R	D.-N. Schul; Bachelorthesis 2015
9	pAe-MenK-Strep	Derivat von 1; zur Produktion von AeMenK in <i>E. coli</i> XL-Blue; Amp ^R	D.-N. Schul; Bachelorthesis 2015
10	pMal-c2X	IPTG induzierbarer Expressionsvektor zur Produktion von MBP-Fusionsproteinen; Amp ^R	NEB
11	pMBP-Ae-MenK	Derivat von 10; zur Produktion von AeMenK in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Amp ^R	Diese Arbeit
12	pRCD-AeMenK2	Derivat von 4, zur Produktion von AeMenK2 in <i>W. succinogenes</i> ; Cm ^R	Diese Arbeit
13	pRCD-AeMenK	Derivat von 4, zur Produktion von AeMenK in <i>W. succinogenes</i> ; Cm ^R	Diese Arbeit
14	pMK2	Vektor zur Expression von Genen innerhalb des <i>nrf</i> -Gen Cluster; Kan ^R	Haase <i>et al.</i> , 2017
15	pMK2-AeMenK2	Derivat von 14; zur Produktion von AeMenK2 in <i>W. succinogenes</i> ; Kan ^R	Diese Arbeit
16	pMK2-AeMenK	Derivat von 14; zur Produktion von AeMenK in <i>W. succinogenes</i> ; Kan ^R	Diese Arbeit
17	pAC-AeMenK2	Derivat von 18; zur Produktion von AeMenK2 in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Cm ^R	Diese Arbeit
18	pACYC-Duet1	IPTG induzierbarer Expressionsvektor mit zwei MCS; Cm ^R	Novagen
19	pAC-Chim1	Derivat von 17; zur Produktion von Chim1 in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Cm ^R	Diese Arbeit
20	pAC-Chim2	Derivat von 17; zur Produktion von Chim2 in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Cm ^R	Diese Arbeit
21	pAC-Chim3	Derivat von 17; zur Produktion von Chim3 in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Cm ^R	Diese Arbeit
22	pET-28(a) +	IPTG induzierbarer Expressionsvektor zur Produktion von His-getaggten Proteinen; Kan ^R	Novagen
23	pET-AeMenK	Derivat von 22; zur Produktion von AeMenK in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Kan ^R	Diese Arbeit
24	pET-FldA	Derivat von 22; zur Produktion von FldA in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Kan ^R	Diese Arbeit
25	pET-Fpr	Derivat von 22; zur Produktion von Fpr in <i>E. coli</i> BL21(DE3); Kan ^R	Diese Arbeit

Tabelle 17 Verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'	Beschreibung
1	pMal-F	TGAGATAAGATTTTCAGCCTGATACAG	Amplifizierung vom pMal-c2X zur Erstellung von pMBP-Ae-menK
2	pMal-R	TCCCTGGAAGTACAGGTTTTCTGTATGGTATGGTATGCCGAGGTTGTTGTTATTGTTATTGTTGTTGTTTCGAGC	
3	AeMenK-Mal-F	CTTTCAGAACGAATGCTTTCCAAGG	
4	AeMenK-Mal-R	TTCTCCGAAAGCCACGGCTTGAGTG	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> zur Erstellung von pMBP-Ae-menK
5	pET28a-CPEC-F	CATATGGCTGCCGCGCGGCACCG	Amplifizierung vom pET28a zur Erstellung von pET28a-AemenK
6	pET28a-CPEC-R	CTCGAGCACCAACCACCACTGAGATC	
7	Aeq0025-pET28a-F	CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTCTCCGAAGCCACGGCTTGAG	
8	Aeq0025-pET28a-R	TGCCGCGCGGCAGCCATATGCTTTCAGAACGAATGCTTTCC	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> zur Erstellung von pET28a-AemenK
9	FldA-F	AAAGAATTCAATGGCTATCACTGGCATCTTTTTC	Amplifizierung vom <i>fldA</i> zur Erstellung von pET28a- FldA
10	FldA-R	AAAGTCGACTCAGGCATTGAGAATTTCGTCG	
11	Fpr-F	AAAGAATTCAATGGCTGATTGGTAACAGGC	
12	Fpr-R	AAAAAGCTTTTACCAGTAATGCTCCGCTGTC	Amplifizierung vom <i>fpr</i> zur Erstellung von pET28a- Fpr
13	Aeq1016-MK2-Rev	CAAAATGGGGATGGCTCCACGCGCTTTTCTCGGTGCCGCGCGAACAGG	Amplifizierung vom <i>Aemenk2</i> zur Erstellung von pMK2-AeMenK2
14	Aeq1016-MK2-For	AGTTAAGTAAATCTAAAAGAAGGAGCCAAAGATGCTCTCGGAGCGCATGCTCAC	
15	Strep-MK2-Rev	AGCGCGTGGAGCCATCCCAATTGAG	
16	Strep-MK2-For	CTTGGCTCCTTCTTTTAGATTAC	Amplifizierung vom pMK2 zur Erstellung von pMK2-AeMenK2 und pMK2-AeMenK
17	UNS3-deltaws0113	CAGCAACACCTTCTTCACGAGGCGAGCCTCAGCGGGATCCGCACTGAAGTCTCCTCAATCG	Amplifizierung von pΔmqnK zur Erstellung von pΔmqnK apr
18	UNS2-deltaws0113	GCTTGGATTCTGCGTTTGTTCGCTCTACGAATCCAGCCCTCCCTCAAAGAATGTCAATTTGG	
19	UNS2-APR	GCTGGGAGTTCTGTAGACGGAACAAACGCAATCCAAGCGGATCCCGTTTTTGTTAATCCGCCA	
20	UNS3-APR	CGACCTTGATGTTTCCAGTGCATTTGAGGACCTTCAGTGATCCCGAATTTCTGCCATTCAATCCGC	Amplifizierung von Apr ^R zur Erstellung von pΔmqnK apr
21	Aeq1016-pAC-F	GTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGCTCTCGGAGCGCATGCTCACTACCGTCGTC	Amplifizierung von <i>AemenK2</i> zur Erstellung von pAC-AeMenK2
22	Aeq1016-pAC-R	TCACTTTTCGAACTGCGGATGGCTCCATGCATCTCGGTGCCGTCGCCGAACAGGAGTCCGG	
23	pAC_Strep-CPEC-F	ATGTATATCTCTTCTTATACTTAAC	
24	pAC_Strep-CPEC-R	GTGCATGGAGCCATCCGCACTTCGAAAAGTGAAATAATCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCG	Amplifizierung von pACYC-Duet1 zur Erstellung von pAC-AeMenK2
25	Aeq1016_218-293-F	GAACGTCGCTGATGGCAGC	Amplifizierung vom pAC- <i>AemenK2</i> Fragment zur Erstellung von pAC-Chim1
26	Aeq1016_218-293-R	GAGGAGTGCCTGGGCATCGG	
27	Aeq1016_DelHemN-F	GTCGGTCTTGCCGAGTAGTGGC	
28	Aeq1016_DelHemN-R	AGTGATGGAGCCATCCGCG	Amplifizierung vom pAC-AemenK2 Fragment zur Erstellung von pAC-Chim2
29	Aeq1016_NVD-R	GGAAGTTGAAGATCATGTCCAGTTGAGGACATTGCAATAG	Amplifizierung vom pAC-AemenK2 Fragment zur Erstellung von pAC-Chim3
30	Aeq1016-CH3	AGTGATGGAGCCATCCGCG	
31	Aeq0025_218_296-F	GCTGCCATCAGACGACGTTCTATCCGCTGATGGCTCGCCG	
32	Aeq0025_WTFNR-R	CCGATGCCACGCACTCCTCGTAATCGACCAGTACTCGTC	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> Fragment zur Erstellung von pAC-Chim1
33	Aeq0025_HemN-F	CACTACTCGGCAAGACCGACTTCTCGCTGCGGACCGCATGC	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> Fragment zur Erstellung von pAC-Chim2
34	Aeq0025_HemN-R	TGCGGATGGTCCATGCATTTCTCCGAAGCCACGGCTTGAG	
35	Aeq0025_NVD-F	CTATTTGCAATCGCTCAACGTGGACATGATCTTCAACTTCC	
36	Aeq0025_HemN-R	TGCGGATGGTCCATGCATTTCTCCGAAGCCACGGCTTGAG	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> Fragment zur Erstellung von pAC-Chim3

Tabelle 17 Verwendete Oligonukleotide. (Fortsetzung)

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'	Beschreibung
37	pAC_Ws0113-R	CGAACTGCGGATGGCTCCATGCACCTCATCTCTGAGCTTAGGCG	Amplifizierung vom <i>WsmqnK</i> Fragment zur Erstellung von pAC-WsMqnK
38	pAC_Ws0113-F	GTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGCTGGCGACTAGGATCGTC	
39	SeqMK-F	CCGAAGTCTAACC GCCACAC	Sequenzierung der pMK2 basierten Plasmide.
40	SeqMK-R	CATCATGAACAATAAACTGTCTGC	
41	pPR-IBA-SeqFor	GAGTTATTTTACCACCTCCCT	Sequenzierung der pET16(a)+ und pPR-IBA3 basierten Plasmide.
42	pPR-IBA-SeqRev	CGCAGTAGCGGTAAACG	
43	pACYADuet-Up1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	Sequenzierung der pACYC-Duet1 basierten Plasmide.
44	T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
45	SeqMal-F	CGTGCCTACTGCGGTGATCAAC	Sequenzierung der pMal-c2X basierten Plasmide.
46	SeqMal-R	CTACTGCCGCCAGGCAAATTC	
47	SoMenK-IBA-R	ATGGTAGGTCTCAAAATGTCTTCTGTTATTCAAACGCTCAACG	Amplifizierung vom <i>SomenK</i> zur Erstellung von pSo-MenK-Strep
48	SoMenK-IBA-R	TGGTAGGTCTCAGCGCTCATATCGCAGGGTTTGAGCGGT	
49	AeMenK-IBA-F	GCTCCGGTCTCTAATGCTTTTCAAGAACGAATGC-	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> zur Erstellung von pAe-MenK-Strep
50	AeMenK-IBA-R	GCCTCTGGTCTCTGCGCTTTTCCCTCCGAAGCCACG	
51	FrpRecovrD-F	TTAGTTTTTCAGAGATTGTCAACCGATACGC	Amplifizierung vom pRecovrD cat Fragment zur Erstellung von pRCD- <i>mqnK</i> ; pRCD-for- <i>AeMenK</i> ; pRCD-for- <i>AeMenK2</i>
52	FrpRecovrD-R	GCAAGTAGCGATTATCTTCTGTGCGGATCC	
53	MqnK-Recfor-F	GAGAGACCATTTATCTTGGTGACGG	Amplifizierung vom <i>WsmqnK</i> Fragment zur Erstellung von pRecovrD-for- <i>mqnK</i>
54	MqnK-Recfor-R	CTATTCTGAGACTAGCGCCTTCAATCGC	
55	Vfb-ΔmqnK-F	GCGAATTCCCCACGCGAGCCTATTTTGGGC	Amplifizierung vom vorderem flankierenden Bereich zur Erstellung von pΔmqnK
56	Vfb-ΔmqnK-R	GCGGATCCCCCTCCCTCAAAGAATGTCATTGG	
57	Hfb-ΔmqnK-F	GCGGATCCAATTCCTTAGGAGCCGCG	Amplifizierung vom hinteren flankierenden Bereich zur Erstellung von pΔmqnK
58	Hfb-ΔmqnK-R	CGCCATGGTGAAAATATCGAAGCCTACTATCC	
59	Aeq0025-MK2-For	AGTTAAGTAAATCTAAAAGAAGGAGCCAAAGATGCTTTCAGAACGAATGCTTTCC	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> zur Erstellung von pMK2-AeMenK
60	Aeq0025-MK2-Rev	CCCTTCTCAAATTGGGGATGGCTCCACGCGCTTTCCCTCCGAAGCCACGGCTTGAG	
61	RCD-Aeq1016-F	CCAAATGACATTCTTTGAGGGAGGGATGCTCTCGGAGCGCATGCTCACTAC	Amplifizierung vom <i>AemenK2</i> zur Erstellung von pRCD-for- <i>AemenK2</i>
62	RCD-Aeq1016-R	TTATTCTCGAACTGAGGTGGCTCCACGCTGATTCTTCGGTGCCGTCGCCGAACAGGAG	
63	MTaseY-F	ATGCTTTCAGAACGAATGCTTTCC	Amplifizierung vom pRCD-mqnK zur Erstellung von pRCD-for- <i>AemenK</i>
64	MTaseY-R	TTCTCCGAAGCCACGGCTTG	
65	WsMqnK-IBA-F	ATGGTAGGTCTCAAATGGCAGAGATGAAGAAAATGGAATTAAT	Amplifizierung vom <i>WsmqnK</i> zur Erstellung von pWS-mqnK-Strep
66	WsMqnK-IBA-R	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCATATCTCTGAGCTTAGGCGAG	
67	RCD-Aeq0025-F	ATGCTTTCAGAACGAATGCTTTCC	Amplifizierung vom <i>AemenK</i> zur Erstellung von pRCD-for- <i>AemenK</i>
68	RCD-Aeq0025-R	TTCTCCGAAGCCACGGCTTG	
69	Seqcat-F	GCCATTGGGATATATCAACGGTGG	Sequenzierung von pRecovrD basierten Plasmiden.
70	pReCovrD-SeqR	CCTTCAATCGCGCTTTCAAGCAG	

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
1,4-Dithiothreitol ≥ 99 %, p.a.	DTT	$C_4H_{10}O_2S_2$	Carl Roth, Karlsruhe
2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-triazin $\geq 99,0$ % (HPLC)	TPTZ	$C_{18}H_{12}N_6$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-log DNA Ladder			New England Biolabs, Frankfurt
4-Chloro-1-Naphtol, ≥ 97 %, für die Biochemie	4-CN	$C_{10}H_7ClO$	Carl Roth, Karlsruhe
4-fach denaturierendem Probenpuffer			New England Biolabs, Frankfurt
5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosin (5'-Meththioadenosin)	MTA	$C_{11}H_{15}N_5O_3S$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5'-Deoxy-5'-(thio)adenosin (5'-Thioadenosin)	t-Ado	$C_{10}H_{13}N_5O_3S$	Prof. Dr. Qi Zhang, Ding <i>et al.</i> , 2017a
5'-Deoxyadenosin	5-Ado	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
7,8-Dimethylmenachinon-6	7,8-DMMK ₆	$C_{43}H_{60}O_2$	Diese Arbeit
7-Methylmenachinon-6	7-MMK ₆	$C_{42}H_{58}O_2$	Diese Arbeit
8-Methyl-2-Demthylmenachinon-8	8-MDMK ₈	$C_{51}H_{72}O_2$	Diese Arbeit
8-Methylmenachinon-6	8-MMK ₆	$C_{42}H_{58}O_2$	Diese Arbeit
Acetonitril, $> 99,98$ %, LC-MS		C_2H_3N	VWR, Darmstadt
Acrylamid-Lösung (37,5:1), Rotiphorese®			Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I, pulv., für die Mikrobiologie			Carl Roth, Karlsruhe
Agarose Standard			Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion, ≥ 98 %, biotinfrei, für die Molekularbiologie	BSA		Carl Roth, Karlsruhe
Ameisensäure ≥ 99 %, LC-MS		CH_2O_2	VWR, Darmstadt
Aminohexansäure ≥ 99 %, zur Synthese		$C_6H_{13}NO_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat ≥ 97 %, p.a., ACS		CH_3COONH_4	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid $\geq 99,5$ %, Ph.Eur.		NH_4Cl	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)Citrat, ca. 18 % Fe		$C_6H_8O_7 \cdot xFe^{3+} \cdot yNH_3$	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)sulfat Hexahydrat, ACS reagent, 99 %		$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien. (Fortsetzung)

Chemikalie	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98 %, p.a., ACS	APS	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat $\geq 99,5$ %, p.a., ACS		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfid 20 % in H_2O		$(\text{NH}_4)_2\text{S}$	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz ≥ 97 %, für die Molekularbiologie und Biochemie		$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin hydrochloride	AHT	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7 \cdot \text{HCl}$	IBA Lifetechnologies
Apramycin	Apr	$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{11}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotin-Blocking-Puffer			IBA GmbH, Göttingen
Borsäure $\geq 99,8$ %, p.a., ACS		$\text{B}(\text{OH})_3$	Carl Roth, Karlsruhe
Brain Heart Infusion Broth	BHI		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau Natriumsalz, für die Elektrophorese		$\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_5\text{SNa}$	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat ≥ 99 %, p.a., ACS		$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol $\geq 98,5$ %, Ph.Eur.	Cmp	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform (deutert) 99,9 %		CDCl_3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform ROTISOLV® $\geq 99,8$ %, UV/IR-Grade		CHCl_3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Color Prestained Protein Standard			New England Biolabs, Frankfurt
Coomassie® Brilliant Blue G250		$\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$	Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Maltose Monohydrat ≥ 92 %, für die Biochemie		$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose $\geq 99,5$ %, p.a.		$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxynukleotid Mix	dNTPs		New England Biolabs, Frankfurt
Deuteriumoxid > 99 %		D_2O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deuteriumoxid $> 99,9$ %		D_2O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
di-Kaliumhydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a., wasserfrei		K_2HPO_4	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® $\geq 99,8$ %, p.a.	DMSO	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien. (Fortsetzung)

Chemikalie	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, $\geq 99,5$ %, p.a.		$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth, Karlsruhe
Distickstoffmonoxid		N_2O	Air Liquide, Frankfurt
DNAse I vom Rinerpankreas, ≥ 2.000 Kunitz units/mg			Carl Roth, Karlsruhe
Eisen(II)chlorid Tetrahydrat $\geq 99,0$ %, p.a.		$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth, Karlsruhe
Eisen(III)-chlorid $\geq 98,5$ %, reinst, wasserfrei		FeCl_3	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure, ROTIPURAN® 100 %, p.a.		$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol $\geq 99,8$ %, absolut, für HPLC		$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 95 %, rein		$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1 %		$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylenediaminetetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat	EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Flavin-Adenin-Dinukleotid-Dinatriumsalz	FAD- Na_2	$\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_9\text{Na}_2\text{O}_{15}\text{P}_2$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Flavinmononukleotid-Natriumsalz	FMN	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_9\text{P}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehydlösung 37 %, zur Synthese		CH_2O	Carl Roth, Karlsruhe
Fuchsin		$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$	Carl Roth, Karlsruhe
Fumarsäure $\geq 99,5$ %, für die Biochemie		$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin, 86-89 % (Titration)		$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{aq}$	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt			Carl Roth, Karlsruhe
Homoserinlacton Hydrochlorid	HSL	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydroxylamin Hydrochlorid $\geq 99,0$ %, p.a., ACS		$\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Imidazol, PUFFERAN® ≥ 99 %, p.a., Ultra Qualität		$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol $\geq 99,7$ %		$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid ≥ 99 %, für die Biochemie	IPTG	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid ≥ 99 %, Ph.Eur., USP		KCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a., ACS		KH_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien. (Fortsetzung)

Chemikalie	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
Kaliumhexacyanoferrat(III)		$K_3Fe(CN)_6$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydroxid ≥ 85 %, p.a.		KOH	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumnitrat ≥ 99 %, p.a.,		KNO_3	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat ≥ 750 I.U./mg	Kan	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	Carl Roth, Karlsruhe
Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat ≥ 98 %, reinst		$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat ≥ 98 %, reinst		$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat ≥ 99 %, Ph.Eur.		$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
L-Arginin $\geq 98,5$ %, für die Biochemie		$C_6H_{14}N_4O_2$	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Agar-Fertigmedium	LB-Agar		Carl Roth, Karlsruhe
LB-Fertigmedium	LB-Medium		Carl Roth, Karlsruhe
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat $\geq 98,5$ %, für die Biochemie		$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure ≥ 99 %, für die Biochemie		$C_5H_9NO_4$	Carl Roth, Karlsruhe
Lysozym ≥ 35.000 FIP U/mg, BioScience-Grade, lyophilisiert			Carl Roth, Karlsruhe
L- α -Phosphatidylcholine ≥ 99 %	PC		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L- α -Phosphatidylethanolamine ≥ 99 % (GC)	PE		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid Hexahydrat ≥ 99 %, p.a., ACS		$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid Monohydrat ≥ 99 %, p.a		$MnCl_2 \cdot H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-sulfat Monohydrat, ≥ 99 %, p.a., ACS		$MnSO_4$	Carl Roth, Karlsruhe
Menachinon-4 (MK-4)-(5,6,7,8-d ₄ ,2-methyl-d ₃), ≥ 98 atom % D	MK ₄ -d ₇	$C_{31}D_7H_{33}O_2$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Menachinon-4, p.a.	MK ₄	$C_{31}H_{40}O_2$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Menachinon-6	MK ₆	$C_{41}H_{56}O_2$	Diese Arbeit
Methanol 99,9 %, für HPLC	MeOH	CH_3OH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan, ≥ 99 %, p.a., für die Elektrophorese	TEMED	$C_6H_{16}N_2$	Carl Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid, $\geq 99,0$ % (Titration)		$(CH_3)_2NC_6H_4NH_2 \cdot 2 HCl$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien. (Fortsetzung)

Chemikalie	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure PUFFERAN® ≥99,5 %, Buffer Grade	Hepes	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat ≥98,5 %, reinst, wasserfrei		NaCH ₃ COO	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, >99,8 %		NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat ≥99 %, für die Biochemie		HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ≥98 %, p.a., ACS		NaH ₂ PO ₄ · x H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumformiat ≥99 %, p.a., ACS		HCOONa	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ≥99 %, Ph.Eur., reinst		NaHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid ≥98 %, Ph.Eur.	NaOH	NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat ≥99 %, für die Biochemie	SDS	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat Dihydrat ≥99,5 %, p.a.		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Resazurin		C ₁₂ H ₆ NNaO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumselenat		Na ₂ SeO ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumsulfid		Na ₂ S	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumsulfit ≥98 %, p.a., ACS, wasserfrei		Na ₂ SO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumsulfit ≥98 %, p.a., ACS, wasserfrei		Na ₂ SO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat ≥99 %, p.a.		NiCl ₂ · 6 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
o-Dianisidin Dihydrochlorid		C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ · 2 HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G für die Mikroskopie und Elektrophorese		C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	Carl Roth, Karlsruhe
S-(5'-Adenosyl)-L-methionine-(S-methyl- ¹³ C)	SAM-d ₃	¹³ CC ₁₄ H ₂₃ ClN ₆ O ₅ S	Prof. Dr. Qi Zhang, Ding <i>et al.</i> , 2017a
S-(5'-Adenosyl)-L-homocysteine	SAH	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
S-(5'-Adenosyl)-L-methionine iodide, ≥80 % (HPLC)	SAM	C ₁₅ H ₂₃ IN ₆ O ₅ S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure 32 %, reinst	HCl	HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure 96 %, p.a.		H ₂ SO ₄	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien. (Fortsetzung)

Chemikalie	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat	Spec	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2 HCl \cdot 5 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff		N_2	Air Liquide, Frankfurt
TB-Medium			Carl Roth, Karlsruhe
Tetrabutylammonium tetrafluoroborat		TBABF ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure ≥ 99 %, Ph.Eur., reinst	TCA	CCl_3COOH	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99,9$ % (Titration)	Tris	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton			Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %, ACS		H_2O_2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wilkins-Chalgren Medium	WC		Carl Roth, Karlsruhe
Xylene Cyanol, für die Histologie und Elektrophorese		$C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Zinkacetat ≥ 95 %, rein, wasserfrei		$C_4H_6O_4Zn$	Carl Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid ≥ 97 %, p.a.		$ZnCl_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Zinksulfat Heptahydrat $\geq 99,5$ %, p.a.		$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
β -Nicotinamidadeninedinukleotide Natriumsalz	NAD ⁺	$C_{21}H_{26}N_7NaO_{14}P_2$	Roche, Basel
β -Nicotinamidadeninedinukleotidphosphate Tetranatriumsalz	NADPH	$C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$	Roche, Basel

Tabelle 19 Verwendete Geräte.

Gerät	Seriennummer	Hersteller
Autoklav Systec DB-23	C 1263	Systec, Wetttemberg
Autoklav Systec VX-150	3804	Systec, Wetttemberg
Biorad Gene Pulser	164BR1631	BIO-RAD, Hercules
Biorad Pulse-Controller	232BR1312	BIO-RAD, Hercules
DS-11+ Spektrophotometer	S01663	DeNOVIX, Wilmington
Eppendorf Research® plus, 10 µl	4837352	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 10 ml	1303803	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 1.000 µl	106955Z	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 20 µl	109833Z	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 200 µl	103084Z	Eppendorf, Hamburg
Gas Analyzer	GA11-057	COY Laboratory Products INC., Grass Lake
Hitachi Elite LaChrom - Autosampler (L-2200, 890-0202)	17E22-029	Hitachi, Tokyo
Hitachi Elite LaChrom - Diodenarray Detektor (L-2450, 890-0452)	1723-015	Hitachi, Tokyo
Hitachi Elite LaChrom - Ofen (L-2350, 890-4020)	1831-020	Hitachi, Tokyo
Hitachi Elite LaChrom - Pumpe (L-2130, 890-1032)	17E26-082	Hitachi, Tokyo
Hitachi Elite LaChrom - Steuereinheit (890-0852)	1615-031	Hitachi, Tokyo
Horizontal Gel Elektrophoresis Kammer - RealSub mini	RELS090410909	Real Laboratory SL, Paterna
Horizontal Gel Elektrophoresis Kammer - RealSub Plus	RELS09111134	Real Laboratory SL, Paterna
Impact II Massenspektrometer	30994	Bruker Daltonik, Bremen
Infinity HPLC System - Pumpe	G1312B	Agilent, Santa Clara
Infinity HPLC System - Autosampler	G1329B	Agilent, Santa Clara
Infinity HPLC System - DAD-Detektor	G4212B	Agilent, Santa Clara
Infinity HPLC System - Entgaser	G4225A	Agilent, Santa Clara
Infinity HPLC System - Säulenofen	G1316C	Agilent, Santa Clara
Infors TR-150	22216	Infors AG, Bottmingen
iNTAS GelStick IMAGER	5516	iNTAS, Göttingen
Lyophylle ALPHA 2-4 LDplus	101542	CHRIST, Osterode am Harz

Tabelle 19 Verwendete Geräte. (Fortsetzung)

Gerät	Seriennummer	Hersteller
Membranfiltrationsanlage 704S/R	708.202.000	Watson-Marlow, Falmouth
Micro-Centrifuge II GMC-060	20710015	LabTech, Heathfield
Mikrowelle 93905775	1731	BOSCH, Stuttgart
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	1658000FC	BIO-RAD, Hercules
Multi-Potentiostat VMP2	88172-1	Princeton Applied Research, Meerbusch
PD Kalysator	CA11-058	COY Laboratory Products INC., Grass Lake
PowerPAC 300	283BR 26178	BIO-RAD, Hercules
PowerPAC 300 HC	043BR27542	BIO-RAD, Hercules
Quadrupole Massenspektrometer	6120	Agilent, Santa Clara
Sonifier 250	100-132-868	BRANSON, Fürth
SpeedVac Concentrator 5301	00144	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer, Genesys 10S UV-Vis	L9N251004	Thermo Fischer Scientific, Waltham
Thermocycler Biometra Tadvanced Basiseinheit	846-x-070-280	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer R	5355 26817	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge, Optima XL-100K	C0X96L11	Beckman Coulter, Brea
Vakuum - Pumpsystem MZ 2C	24920507	vacuubrand, Wertheim
Vortex Reax 2000	541.19000.00	Heidolph, Schwabach
Zellpresse - French Press FA - 078	9102433	AMINCO
Zentrifuge 5415D	5425 46363	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sigma 6-16KS	150934	Sigma, Osterode am Harz

Tabelle 20 Korrelation der MqnK/MenK Enzyme in Organismen mit einem Homolog für das MccA.

Organismus	Kandidat MqnK/MenK	Kandidat MccA
Phylum Proteobacteria		
Klasse Epsilonproteobacteria, Ordnung Campylobacterales		
Familie Helicobacteraceae		
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	CAE09279.1	CAE09526.1
Familie Campylobacteraceae		
<i>Sulfurospirillum deleyianum</i> DSM 6946	WP_012856078.1	ACZ11738.1
<i>Sulfurospirillum barnesii</i> SES-3	WP_014768498.1	AFL68074.1
<i>Sulfurospirillum multivorans</i> DSM 12446	WP_025343548.1	AHJ14079.1
<i>Sulfurospirillum cavolei</i> UCH003	WP_060826118.1	WP_060826123.1
<i>Sulfurospirillum</i> sp. MES	KHG34833.1	KHG33545.1
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i> DSM 13726	WP_069477079.1	AOO66383.1
<i>Campylobacter gracilis</i> RM 3268	WP_100067307.1	WP_005870893.1
<i>Campylobacter showae</i> RM 3277	WP_002949356.1	EET78641.1
<i>Campylobacter showae</i> CC57C	WP_002953562.1	EMG30019.1
<i>Campylobacter showae</i> CSUNSWCD	WP_009495466.1	EKU11254.1
<i>Campylobacter concisus</i> 13826	WP_012001117.1	EAT99167.1
<i>Campylobacter concisus</i> UNSWCD	WP_004318049.1	EIF07053.1
<i>Campylobacter rectus</i> RM 3267	WP_002944906.1	EEF15282.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 1336	WP_087684867.1	EFC31708.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81116	WP_002877497.1	ABV51630.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 260.94	EAQ59076.1	EAQ58758.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81-176	EAQ73007.1	EAQ71979.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ICDCCJ07001	ADT65740.1	ADT65457.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 1213	EIB74604.1	EIB73827.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> LMG 23211	EIB92845.1	EIB88227.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> LMG 23357	WP_002880480.1	EIB36535.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> HB93-13	AQ59980.1	EAQ59721.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 1997-11	EIB64466.1	EIB63797.1
<i>Campylobacter lari</i> RM 2100	WP_012662244.1	ACM64133.1
<i>Campylobacter curvus</i> 525.92	EAU00615.1	EAU00307.1
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> ATCC 35217	WP_063998866.1	WP_034961159.1
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 006A-0161	CUU83164.1	WP_059429950.1
<i>Campylobacter fetus</i> 006A-0059	WP_059427317.1	WP_059425529.1
Klasse Gammaproteobacteria, Ordnung Alteromonadales, Familie Shewanellaceae		
<i>Shewanella marisflavi</i> EP1	ASJ95163.1	WP_088903641.1
<i>Shewanella loihica</i> PV-4	WP_011863883.1	ABO22220.1
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	WP_020914961.1	ACJ31293.1

Tabelle 20 Korrelation der MqnK/MenK Enzyme in Organismen mit einem Homolog für das MccA.
(Fortsetzung)

Organismus	Kandidat MqnK/MenK	Kandidat MccA
<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3	WP_012144743.1	ABV35106.1
<i>Shewanella pealeana</i> ATCC 700345	ABV89436.1	ABV85831.1
<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4	ABZ74692.1	ABZ75142.1
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	ACA89055.1	ACA88708.1
<i>Shewanella baltica</i> OS195	ABX51397.1	ABX51162.1
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	WP_012327372.1	ACA88728.1
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	WP_011074137.1	AAN53560.2
<i>Shewanella pealeana</i> ATCC 700345	WP_012157314.1	ABV85807.1
<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4	WP_012275249.1	ABZ75126.1
<i>Shewanella</i> sp. MR-4	ABI40793.1	ABI37568.1
<i>Shewanella</i> sp. MR-7	ABI44780.1	ABI44522.1
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	WP_011718647.1	ABK46730.1
<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	WP_011787793.1	ABM23428.1
<i>Shewanella putrefaciens</i> 200	ADV52852.1	ADV55880.1
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	WP_011920063.1	ABP77076.1
<i>Shewanella baltica</i> OS185	WP_012090507.1	ABS10001.1
<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3	WP_012144743.1	ABV35095.1
Familie Ferrimonadaceae		
<i>Ferrimonas balearica</i> DSM 9799	WP_013347215.1	ADN75871.1
<i>Ferrimonas balearica</i> DSM 9799	WP_013347215.1	ADN75878.1
Ordnung Enterobacterales, Familie Hafniaceae		
<i>Edwardsiella ictaluri</i> 93-146	-	ACR70768.1
<i>Edwardsiella tarda</i> EIB202	-	ACY86106.1
<i>Edwardsiella tarda</i> ATCC 23685	-	EFE21320.1
Klasse Deltaproteobacteria, Ordnung Myxococcales , Familie Anaeromyxobacteraceae		
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	-	ACL66494.1
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. K	-	ACG74273.1
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	-	ABC82733.1
Klasse Betaproteobacteria, Ordnung Burkholderiales, Familie Sutterellaceae		
<i>Sutterella wadsworthensis</i> 2_1_59BFAA	EKB31741.1	EKB31407.1
<i>Sutterella parvirubra</i> YIT 11816	WP_008543498.1	EHY30852.1
<i>Burkholderiales bacterium</i> 1_1_47	WP_008810232.1	EFL81946.1
<i>Parasutterella excrementihominis</i> YIT 11859	EGG57223.1	EGG52939.1
<i>Sutterella parvirubra</i> YIT 11816	EHY30427.1	EHY31549.1
<i>Sutterella wadsworthensis</i> 3_1_45B	WP_005429274.1	EFW02247.1

14. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Eller, J., **Hein, S.**, & Simon, J. (2019) Significance of MccR, MccC, MccD, MccL and 8-methylmenaquinone in sulfite respiration of *Wolinella succinogenes*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1860**: 12-21.

Hein, S., von Irmer, J., Gallei, M., Meusinger, R., & Simon, J. (2018) Two dedicated class C radical *S*-adenosylmethionine methyltransferases concertedly catalyse the synthesis of 7,8-dimethylmenaquinone. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1859**: 300-308.

Hein, S., Witt, S., & Simon, J. (2017) Clade II nitrous oxide respiration of *Wolinella succinogenes* depends on the NosG, -C1, -C2, -H electron transport module, NosB and a Rieske/cytochrome *bc* complex. *Environ Microbiol*, **19**: 4913-4925.

Hein, S., Klimmek, O., Polly, M., Kern, M., & Simon, J. (2017) A class C radical *S*-adenosylmethionine methyltransferase synthesizes 8-methylmenaquinone. *Mol Microbiol*, **104**: 449-462.

Während dieser Arbeit wurde an folgenden Publikationen mitgearbeitet:

Levisson, M., Patinios, C., **Hein, S.**, de Groot, P. A., Daran, J. M., Hall, R. D., Martens. S. & Beekwilder, J. (2018) Engineering *de novo* anthocyanin production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fac*, **17**: 103.

Saravanan, T., Junker, S., Kickstein, M., **Hein, S.**, Link, M. K., Ranglack, J., Witt, S., Lorillière, M., Hecquet, L., & Fessner, W. D. (2017) Donor Promiscuity of a Thermostable Transketolase by Directed Evolution: Efficient Complementation of 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Synthase Activity. *Angew Chem Int Ed Engl*, **56**: 5358-5362.

15. Konferenzbeiträge

Während dieser Arbeit wurden folgende Beiträge durch mich oder durch mein Zutun auf internationalen und nationalen Konferenzen geleistet. (*: Vortragender)

Wissenschaftliche Vorträge

23rd European Nitrogen Cycle Meeting, 2018, Alicante, Spanien

- Laughing gas respiration of *Wolinella succinogenes*: composition and function of the electron transport chain
S. Hein*, V. Mijić, C. Werner, S. Witt, J. Simon

9th Meeting on Bacterial electron transfer processes & their regulation; 2018, Saint Tropez, Frankreich

- Composition and function of electron transport proteins involved in nitrous oxide respiration
S. Hein, S. Witt, J. Simon*
- Two dedicated class C radical SAM methyltransferases synthesize the low-potential redox mediators 8-methylmenaquinone and 7,8-dimethylmenaquinone
S. Hein*, O. Klimmek, M. Kern, J. von Irmer, M. Gallei, R. Meusinger, J. Simon

VAAM-Jahrestagung 2018, Wolfsburg, Deutschland

- Two dedicated class C radical SAM methyltransferases synthesize the low-potential redox mediators 8-methylmenaquinone and 7,8-dimethylmenaquinone
S. Hein*, O. Klimmek, M. Kern, J. von Irmer, M. Gallei, R. Meusinger, J. Simon

VAAM-Jahrestagung 2016, Jena, Deutschland

- A class C radical S-adenosylmethionine methyltransferase synthesizes 8-methylmenaquinone
O. Klimmek*, **S. Hein**, D.-N. Schul, M. Polly, M. Kern, J. Simon

Poster

9th Meeting on Bacterial electron transfer processes & their regulation; 2018, Saint Tropez, Frankreich

- Sulfite respiration in *Wolinella succinogenes*: the role of MccC and MccD
J. Eller*, **S. Hein**, J. Simon

VAAM-Jahrestagung 2018, Wolfsburg, Deutschland

- Sulfite respiration in *Wolinella succinogenes*: the role of MccC and MccD
J. Eller*, **S. Hein**, J. Simon
- *Halobacterium salinarum* under heavy metal stress: A proteomic comparison between planktonic cells and biofilms
S. Völkel*, C. Lenz, N. Benker, **S. Hein**, G. Losensky, F. Pfeifer

VAAM-Jahrestagung 2017, Würzburg, Deutschland

- Biosynthesis of methylmenaquinone
S. Hein*, O. Klimmek, J. Simon
- Growing on laughing gas as sole electron acceptor: the case of *Wolinella succinogenes*
S. Hein*, S. Witt, J. Simon

16. Stipendien

Während dieser Arbeit wurden folgende Stipendien an mich verliehen.

09.2018: FEMS Meeting Attendance Grant

03.2018: FEMS Meeting Attendance Grant

17. Beiträge Anderer

Die hier präsentierten Daten wurden von mir erstellt, analysiert und ausgewertet mit der Ausnahme von:

Kapitel 1

- Apl. Prof. Dr. Reinhard Meusinger (Fachbereich Chemie) nahm die NMR-Spektren auf.
- Christiane Rudolph (MS-Abteilung, Fachbereich Chemie) führte die MS-Messungen durch.
- Markus Polly (Master-Student) erstellte das Plasmid pRCD-Aeq0025.
- David-Nikola Schul (Bachelor-Student) erstellte die Plasmide pSo-MenK-Strep und pAe-MenK-Strep.

Kapitel 2

- Dennis Wilkens (Master-Student) erstellte das Plasmid pAC-WsMqnK und den Stamm *E. coli* BL21(DE3) pAC-WsMqnK und führte dessen Chinonanalyse durch.

Kapitel 3

- In Zusammenarbeit mit Samantha Witt (Master-Studentin) wurden die in Abbildung 51 dargestellten Daten erhoben.
- Dr. Melanie Kern erstellte das Deletionsplasmid p Δ mqnK.

Kapitel 4

- Christiane Rudolph (MS Abteilung, Fachbereich Chemie) führte die HPLC-APCI-HR-MS Messungen durch.

18. Curriculum Vitae

Name: Sascha Hein
Geburtsdatum: 30.04.1991
Geburtsort: Gummersbach

Akademische Ausbildung

10.2015 – Aktuell **Technische Universität Darmstadt**

Doktorand im Arbeitskreis Mikrobielle Energieumwandlung und Biotechnologie.
Betreuer: Prof. Dr. Simon

10.2013 – 09.2015 **Technische Universität Darmstadt**

M. Sc. in Biomolecular Engineering, mit Auszeichnung,
Titel der Masterarbeit: Rote Hefen: Produktion von Anthocyanen in *Saccharomyces cerevisiae*.
Betreuer: Prof. Dr. Simon und Dr. Stefan Martens

10.2010 – 09.2013 **Technische Universität Darmstadt, Darmstadt**
(Deutschland)

B. Sc. in Biomolecular Engineering,
Titel der Bachelorarbeit: Das aktive Zentrum der Cytochrom c-Nitritreduktase von *Campylobacter jejuni*.
Betreuer: Prof. Dr. Simon

08.2007 – 06.2010 **Berufskolleg Olsberg, Olsberg**

Ausbildung zum staatlich geprüften Biologisch-technischen Assistenten

Schulische Bildung

08.2007 – 06.2010 **Berufskolleg Olsberg, Olsberg**

Fachabitur (Richtung: Naturwissenschaften)

08.2001 – 06.2007 **Realschule Bergneustadt, Bergneustadt**

Mittlere Reife

19. Danksagung

Bis hierher waren es nicht nur knapp 150 Seiten, sondern auch drei Jahre voller Enthusiasmus, Spannung, Erfolge, neuen Erkenntnissen und einen ganzen Berg an Arbeit. Ohne die Hilfe anderer wäre dieser nicht zu bewerkstelligen gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Simon, für die Möglichkeit an diesem Thema zu Arbeiten, die konstruktiven Anregungen, die freie Gestaltung des Themas und die zahlreichen Einblicke in weitere Themen wie die „Lachgas-Respiration“. Ebenso danke ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Warzecha, nicht nur für die Begutachtung dieser Arbeit, sondern auch für die Möglichkeit in seinem Labor die LC-MS Analysen durchzuführen.

Meinen Kollegen aus dem Fachbereich Chemie Apl. Prof. Dr. Reinhard Meusinger, Dr.-Ing. Markus Gallei, Jonas von Irmer, Dr. Schießler und Christiane Rudolph möchte ich für die tolle Kooperation in den vergangenen drei Jahren danken. Auch für die spontanen Problemlösungen und die Flexibilität, wenn mal eine der „gesuchten Massen“ nicht direkt gefunden wurde oder die Entwicklung der „Mikro-CV-Zelle“ aus einem HPLC-Vial.

Frau Prof. Dr. Pfeifer, PD. Dr. Kletzin, sowie deren Arbeitsgruppen danke ich für die zahlreichen Ideen, genutzten Geräte und den „geborgten“ Chemikalien ohne die so manch ein Experiment einige Tage länger gedauert hätte.

Einen großen Dank auch an Prof. Qi Zhang (Fudan Universität, Shanghai) nicht nur für die beiden Chemikalien SAM-d₃ und t-Ado, sondern auch das persönliche Treffen in München und die intensive Diskussion über den Reaktionsmechanismus von MenK und NosN.

Dr. Volk und Marcus Geißler aus der Arbeitsgruppe Warzecha möchte ich für die Methodenentwicklung und Einführung in die LC-MS danken, ohne die es nicht möglich gewesen wäre die Stöchiometrie der Reaktionsprodukte aufzuklären.

Der gesamten Arbeitsgruppe Simon und auch den Ehemaligen - insbesondere Dr. Kern und Dr. Klimmek - gilt ein großer Dank. Für die Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und vielen Tipps, die mich von Tag zu Tag weitergebracht haben.

Jede noch so kleine „gepickte Kolonie“ oder PCR hat diese Arbeit angetrieben, daher gilt mein Dank auch den Master- und Bachelorstudenten Dennis Wilkens, Markus Polly und David Schul.

Samantha Witt möchte ich für die Unterstützung, die ich über die Jahre von ihr erfahren habe danken. Danke, dass du immer für mich da warst.

Meinen Eltern Irina und Fjodor sowie meiner gesamten Familie bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ihr habt mir erst das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht.

VIELEN DANK!

20. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 04.03.2019



.....